

Université de Montréal

**Caractérisation des pathotypes d'*Escherichia coli* dans les eaux des Grands Lacs
à l'aide d'une biopuce d'ADN**

par

KATIA HAMELIN

**Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
de Maître ès sciences (M. Sc.)
en microbiologie et immunologie**

**Juin, 2006
© Katia Hamelin, 2006**



W

4

058

2006

√.144

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation des pathotypes d'*Escherichia coli* dans les eaux des Grands Lacs
à l'aide d'une biopuce d'ADN**

présenté par
KATIA HAMELIN

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....
Dr George Szatmari, Président-rapporteur

.....
Dr Roland Brousseau, directeur de recherche

.....
Dre France Daigle, membre du jury

Résumé

Bien que la bactérie *Escherichia coli* soit reconnue mondialement comme une cause majeure d'infections chez l'humain, il y a très peu d'études sur la prévalence des *E. coli* pathogènes dans l'environnement. En utilisant une biopuce d'ADN détectant plus de 180 gènes de virulence et 30 gènes de résistance aux agents antimicrobiens, nous avons mené des recherches sur la pathogénicité de *E. coli* dans les eaux des Grands Lacs.

Dans une première étude, 308 souches de *E. coli* ont été prélevées dans le port de Hamilton et le pathotype a été caractérisé sur notre biopuce. Un résultat élevé de 29 % de pathogènes et 14 % portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens a été trouvé, ce qui sous-entend un risque potentiel pour la santé publique.

Dans une deuxième étude, 309 souches de *E. coli* ont été prélevées dans plusieurs sites situés dans la région Détroit/Windsor et touchés par des classes de pollution très différentes. Contrairement aux zones agricoles ou naturelles, la zone de pollution urbaine contenait un fort pourcentage de *E. coli* pathogènes (48 %) et portant des gènes de résistance (27 %) aux agents antimicrobiens.

Dans les deux études, les résultats ont démontré un pourcentage élevé de souches portant des combinaisons de gènes inusitées qui n'auraient pas été remarquées par les techniques traditionnelles comme le PCR. Les biopuces d'ADN peuvent donc avoir un important impact sur la santé publique, l'épidémiologie et l'écologie microbienne dans le futur.

Mots clés : gènes de virulence/ gènes d'antibiorésistance/ eau de surface

Summary

Although the bacterium *Escherichia coli* is recognized universally as a major cause of infections in human, there are very few studies based on the prevalence of pathogenic *E. coli* in the environment. By using a DNA microarray detecting more than 180 virulence genes together with 30 antimicrobial resistance genes, a survey of pathogenic *E. coli* in the Great Lakes water was carried out.

In a first study, a total of 308 *E. coli* isolates were collected in Hamilton harbor and the pathotype was characterized on our microarray. A high proportion of pathogenic *E. coli* (29 %) and isolates carrying antimicrobial resistance genes (14 %) was found, which is consistent with a potential risk for public health.

In a second study, a total of 309 *E. coli* isolates were collected in many sites located in Detroit/Windsor region and contaminated by different levels of pollution. The site with urban pollution showed a higher proportion of pathogenic *E. coli* (48 %) and isolates carrying antimicrobial resistance genes (27 %) than in sites with agricultural or natural pollution.

In the two studies, the results showed a high proportion of isolates carrying unusual virulence genes combinations that would be missed by conventional screening like PCR. This application of DNA microarray will have important impact on public health, epidemiology and microbial ecology in the future.

Keywords: *Escherichia coli*/ microarray/ virulence genes/ antimicrobial resistance genes/ surface waters

Table des matières

| | |
|--|--------------|
| Identification du jury..... | ii |
| Résumé..... | iii |
| Summary..... | iv |
| Table des matières..... | v |
| Liste des tableaux..... | ix |
| Liste des figures..... | xi |
| Liste des sigles et abréviations..... | xii |
| Remerciements..... | xv |
| SECTION I – Introduction..... | 1 |
| Recension de la littérature..... | 2 |
| 1.0 Impact de l'eau sur la santé humaine..... | 2 |
| 2.0 Micro-organismes pathogènes dans l'eau..... | 3 |
| 2.1 Pathogènes historiques..... | 3 |
| 2.2 Pathogènes émergents..... | 4 |
| 3.0 Sources des pathogènes dans les milieux aquatiques naturels..... | 7 |
| 4.0 Indicateur de contamination fécale de l'eau..... | 9 |
| 5.0 La bactérie <i>Escherichia coli</i> | 10 |
| 5.1 Historique..... | 10 |
| 5.2 Épidémies associées à la nourriture..... | 11 |
| 5.3 Épidémies associées à l'eau..... | 12 |
| 6.0 Les pathotypes entériques de <i>E. coli</i> | 14 |
| 6.1 Les <i>E. coli</i> entéropathogéniques (EPEC) | 14 |
| 6.2 Les <i>E. coli</i> entérotoxigéniques (ETEC) | 15 |
| 6.3 Les <i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC) | 15 |
| 6.4 Les <i>E. coli</i> entéroagrégatifs (EAEC) | 16 |
| 6.5 Les <i>E. coli</i> entéroinvasifs (EIEC) | 16 |
| 6.6 Les <i>E. coli</i> à adhérence diffuse (DAEC) | 17 |
| 7.0 Les pathotypes extra-intestinaux de <i>E. coli</i> (ExPEC) | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 7.1 Les <i>E. coli</i> uropathogènes (UPEC) | 18 |
| 7.2 Les <i>E. coli</i> septicémiques (SEPEC) | 19 |
| 7.3 Les <i>E. coli</i> associés à la méningite (MNEC) | 19 |
| 8.0 Plasticité du génome de <i>E. coli</i> | 20 |
| 8.1 Les pathotypes non-standards | 20 |
| 9.0 Groupes phylogénétiques..... | 22 |
| 10.0 Biopuce d'ADN..... | 23 |
| 11.0 La résistance aux agents antimicrobiens..... | 25 |
| Problématique..... | 27 |
| SECTION II – Méthodologie et Résultats..... | 30 |
| Article I : A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in <i>Escherichia coli</i> from Great Lakes recreational waters..... | 31 |
| Contribution à l'article I..... | 32 |
| A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in <i>Escherichia coli</i> from Great Lakes recreational waters..... | 33 |
| Abstract..... | 34 |
| Introduction..... | 35 |
| Materials and methods..... | 37 |
| <i>Water sampling and E. coli isolation.....</i> | <i>37</i> |
| <i>DNA extraction.....</i> | <i>37</i> |
| <i>E. coli DNA labeling.....</i> | <i>38</i> |
| <i>DNA microarray.....</i> | <i>38</i> |
| <i>Hybridization of labeled DNA.....</i> | <i>38</i> |
| <i>Statistical analysis.....</i> | <i>39</i> |
| Results..... | 40 |
| <i>Water sampling and E. coli isolation.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Prevalence of E. coli isolates possessing virulence genes.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Pathotype distribution according to the location and the season..</i> | <i>42</i> |

| | |
|---|-----------|
| <i>Prevalence of antimicrobial resistance genes.....</i> | 43 |
| <i>Avian fecal pollution on beach.....</i> | 44 |
| Discussion..... | 45 |
| Acknowledgments..... | 48 |
| References..... | 49 |
| Tables..... | 54 |
| Article II : Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in <i>Escherichia coli</i> from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas..... | 59 |
| Contribution à l'article II..... | 60 |
| Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in <i>Escherichia coli</i> from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas..... | 61 |
| Abstract..... | 62 |
| Introduction..... | 63 |
| Materials and methods..... | 65 |
| <i>Study area.....</i> | 65 |
| <i>Water sampling and E. coli isolation.....</i> | 65 |
| <i>DNA extraction.....</i> | 66 |
| <i>E. coli DNA labeling.....</i> | 66 |
| <i>DNA microarray.....</i> | 67 |
| <i>Hybridization of labeled DNA.....</i> | 67 |
| <i>Pathotype and phylogenetic group classification.....</i> | 68 |
| <i>Statistical analysis.....</i> | 68 |
| Results..... | 69 |
| <i>Site-specific distribution of E. coli isolates according to the pathotype.....</i> | 69 |
| <i>Phylogenetic group distribution.....</i> | 70 |
| <i>Site-specific distribution of E. coli isolates possessing antimicrobial resistance genes.....</i> | 70 |

| | |
|---|------------|
| <i>Site-specific distribution of E. coli isolates possessing a tsh gene</i> | 71 |
| Discussion..... | 72 |
| Acknowledgments..... | 76 |
| References..... | 77 |
| Tables and figure..... | 81 |
| SECTION III – Discussion | 89 |
| Discussion | 90 |
| Étude sur les isolats <i>Escherichia coli</i> dans le port de Hamilton | 90 |
| 1.0 Comparaison avec les études antérieures..... | 92 |
| 1.0.1 Choix du milieu d'échantillonnage..... | 92 |
| 1.0.2 Influence de la méthode de culture..... | 92 |
| 1.0.3 Techniques de criblage..... | 93 |
| 1.1 Prévalence de <i>E. coli</i> pathogènes..... | 93 |
| 1.2 Prévalence de <i>E. coli</i> portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens..... | 96 |
| 1.3 Diversité génétique..... | 97 |
| Étude sur les isolats <i>Escherichia coli</i> de divers écosystèmes aquatiques | 99 |
| 2.0 Modification de la biopuce..... | 100 |
| 2.1 Prévalence de <i>E. coli</i> pathogènes | 100 |
| 2.2 Prévalence de <i>E. coli</i> portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens..... | 103 |
| 2.3 Pathotypes entériques..... | 104 |
| 2.4 <i>E. coli</i> portant le gène <i>tsh</i> (indicateur aviaire) | 105 |
| 2.5 Classification en groupes phylogénétiques..... | 105 |
| 2.6 Expériences à venir..... | 106 |
| Conclusion | 108 |
| SECTION IV – Bibliographie | 110 |

Liste des tableaux

| | |
|---|---------------|
| SECTION II – Méthodologie et Résultats..... | 30 |
| Article I : A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in <i>Escherichia coli</i> from Great Lakes recreational waters..... | 33 |
| <i>Table 1 : Pathotype and antimicrobial resistance of all E. coli isolates.....</i> | <i>54</i> |
| <i>Table 2a : Pathotypes and presence of antimicrobial resistance genes in E. coli isolates according to sampling location during spring.....</i> | <i>55</i> |
| <i>Table 2b : Pathotypes and presence of antimicrobial resistance genes in E. coli isolates according to sampling location during summer.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Table 3 : Distribution of antimicrobial resistance genes in E. coli according to season and location.....</i> | <i>57</i> |
| <i>Table 4 : Characterization of antimicrobial resistance genes present in E. coli isolates.....</i> | <i>58</i> |
| Article II : Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in <i>Escherichia coli</i> from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas..... | 61 |
| <i>Table 1 : Description of the sampling locations in different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas.....</i> | <i>81</i> |
| <i>Table 2a : Percentage of E. coli pathotypes among isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas.....</i> | <i>82</i> |
| <i>Table 2b : Frequency of phylogenetic groups among E. coli isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas.....</i> | <i>83</i> |

| | |
|---|-----------|
| <i>Table 3 : Frequency of pathotypes and antimicrobial resistance genes among E. coli isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas according to phylogenetic groups (total of isolates).....</i> | <i>84</i> |
| <i>Table 4 : Frequency of antimicrobial resistance gene positive E. coli isolates belonging to different pathotypes in different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas.....</i> | <i>85</i> |
| <i>Table 5 : Frequency of antimicrobial resistance genes among 309 E. coli isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas.....</i> | <i>86</i> |
| <i>Table 6 : Frequency of tsh gene positive E. coli isolates belonging to different pathotypic groups in various aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas.....</i> | <i>87</i> |

Liste des figures

| | |
|---|---------------|
| SECTION I – Introduction..... | 1 |
| Recension de la littérature..... | 2 |
| <i>Figure 1 : Résultat d'un E. coli marqué et hybridé sur une biopuce d'ADN.....</i> | <i>24</i> |
| SECTION II – Méthodologie et Résultats..... | 30 |
| Article II : Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in <i>Escherichia coli</i> from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas..... | 61 |
| <i>Figure 1 : Map of St. Clair River and Detroit River areas.....</i> | <i>88</i> |
| SECTION III – Discussion..... | 89 |
| Étude sur les isolats <i>Escherichia coli</i> dans le port de Hamilton..... | 90 |
| <i>Figure 2 : Carte géographique du port de Hamilton.....</i> | <i>91</i> |
| Étude sur les isolats <i>Escherichia coli</i> de divers écosystèmes aquatiques..... | 99 |
| <i>Figure 3 : Circulation du courant dans le lac St-Clair en fonction de l'impact de la voie maritime</i> | <i>101</i> |

Liste des sigles et abréviations

| | |
|-------------------|---|
| ADN (DNA) | Acide désoxyribonucléique (desoxyribonucleic acid) |
| AWWA | American Water Works Association |
| BSA | Bovine serum albumin |
| <i>C. coli</i> | <i>Campylobacter coli</i> |
| CDC | Centers for Disease Control and prevention |
| CDEC | Cell-detaching <i>Escherichia coli</i> |
| <i>C. jejuni</i> | <i>Campylobacter jejuni</i> |
| <i>C. parvum</i> | <i>Cryptosporidium parvum</i> |
| Cy5 | Cyanine 5 |
| DAEC | Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i> |
| dATP | deoxyadenosine triphosphate |
| dCTP | deoxycytidine triphosphate |
| dGTP | deoxyguanosine triphosphate |
| dNTP | deoxyribonucleoside triphosphate |
| dTTP | deoxythymidine triphosphate |
| EAF | Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> adherence factor |
| EC-MUG | <i>Escherichia coli</i> broth with methylumbelliferyl- β -glucuronide |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EAEC | Enteraggative <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylene-diamine-tetra-acetic acid |
| EHEC | Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> |
| EIEC | Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> |
| EPEC | Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> |
| ETEC | Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> |
| ExPEC | Extraintestinal <i>Escherichia coli</i> |
| <i>G. lamblia</i> | <i>Giardia lamblia</i> |

| | |
|-----------------------|---|
| ISOMET | Isolation strategy for trace metal analysis |
| LCDC | Laboratory centre for disease control |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>Legionella pneumophila</i> |
| MMWR | Morbidity and Mortality Weekly Report |
| MNEC | Meningitis-associated <i>Escherichia coli</i> |
| NTEC | Necrotoxic <i>Escherichia coli</i> |
| NWRI | National Water Research Institute |
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| ONU | Organisation des nations unies |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PAI | Pathogenicity island |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RNase A | Ribonuclease A |
| SHU | Syndrome hémolytique urémique |
| spp. | Species |
| SSC | Solution saline citrate |
| <i>S. sonnei</i> | <i>Shigella sonnei</i> |
| <i>S. typhi</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| UFC | Unité formatrice de colonies |
| UPEC | Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> |
| U.S. | United States |
| USEPA | United States Environment Protection Agency |
| UTI | Urinary tract infection |
| SCRCA | St. Clair Region Conservation Authority |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| SEPEC | Septicemic <i>Escherichia coli</i> |

Unités de mesure

| | |
|-------|-----------------|
| C | Celsius |
| L | litre |
| m | mètre |
| M | molaire |
| min | minute |
| mg | milligramme |
| mL | millilitre |
| mm | millimètre |
| mM | millimolaire |
| nm | nanomètre |
| U | unité |
| µg | microgramme |
| µL | microlitre |
| µm | micromètre |
| v / v | volume / volume |
| w / v | weight / volume |

Symboles

| | |
|----|-------------------|
| β | bêta |
| ° | degré |
| < | plus petit que... |
| \$ | dollar |

Remerciements

Je voudrais d'abord et avant tout remercier mon directeur de recherche, le Dr Roland Brousseau, de m'avoir donné la possibilité d'effectuer mon stage de maîtrise dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance pour mener à terme un projet aussi intéressant. Son support, ses connaissances et ses conseils tout au long de ma maîtrise ont été indispensables à ma réussite.

Je tiens également à remercier tous les co-auteurs pour vos conseils, votre dévouement et votre participation active à ce projet. Un merci particulier à Guillaume Bruant pour son aide et sa patience lors de la classification des souches de *E. coli* et au Dr Luke Masson pour ses judicieux conseils.

J'aimerais aussi souligner la participation du Réseau Canadien de l'Eau et d'Environnement Canada et je les remercie d'avoir permis la réalisation de ce projet.

Je voudrais également citer quelques personnes à qui je dois beaucoup pour leur aide et leur amitié au cours de ces deux années : Alberto Mazza, Marc Juteau, Christine Maynard, Julie Champagne, Miria Elias, Liliane Meunier et Manuela van Munster. Merci pour tous les beaux moments que nous avons passés ensemble.

Enfin, je remercie mes amies qui, bien que je ne sois pas souvent présente, m'ont toujours offert leur amitié et leur soutien, ainsi que ma famille pour leur amour, leur patience et pour avoir cru en moi jusqu'à la fin.

SECTION I – Introduction

Recension de la littérature

1.0 Impact de l'eau sur la santé humaine

Après l'oxygène, l'eau est sans aucun doute la plus importante ressource naturelle nécessaire à la maintenance et au bien-être de la vie humaine. Bien que la qualité de l'eau de consommation soit généralement prise pour acquis dans les pays développés, elle n'en demeure pas moins un sujet d'inquiétude majeur du public et des organismes gouvernementaux de la santé. En 1997, l'Organisation des Nations Unies (ONU) a estimé qu'environ un milliard de personnes à travers le monde n'avaient pas accès à de l'eau potable (ONU, 1997). Avec la croissance globale de la population et l'augmentation de la consommation d'eau, la conservation de l'eau et la protection des réservoirs d'eau douce joueront un rôle vital pour la survie de l'être humain dans un futur proche. La meilleure façon d'assurer la propreté, la salubrité et la fiabilité des approvisionnements en eau potable consiste à suivre une méthode de gestion des risques axée sur la prévention. Il faut pour cela comprendre chaque approvisionnement en eau, de la source d'origine dans la nature jusqu'à son point de destination, le consommateur. Comme les micro-organismes pathogènes dans l'eau ont un potentiel de risque au moins aussi élevé que les polluants chimiques (Emde, 1995), l'identification de ceux-ci est importante pour la protection de la santé publique.

Dans le passé, des épidémies massives de choléra et de fièvre typhoïde en Europe et en Amérique du Nord ont clairement démontré la relation directe entre la qualité de l'eau, la salubrité des installations sanitaires et les maladies infectieuses. La présence de micro-organismes pathogènes dans les systèmes d'approvisionnement en eau et dans les eaux de récréation indique que la surveillance de la qualité de l'eau est un élément crucial dans la protection de la santé publique. En 2004, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a estimé à 1.6 millions le nombre de décès chaque année liés à une consommation d'eau non-potable, à des installations sanitaires non-appropriées et à une mauvaise hygiène (OMS, 2004).

2.0 Micro-organismes pathogènes dans l'eau

Durant la période allant de 1971 à 2000, 1010 éclosions d'infections liées à l'eau ont été rapportées aux États-Unis causées majoritairement par des micro-organismes infectieux (Craun and Calderon, 2003). Durant ces trente années, un total de 94 personnes sont décédées dû au contact direct (via l'eau de consommation) ou indirect (baignade et autres activités aquatiques) avec de l'eau contaminée (Craun and Calderon, 2003). Bien que la plupart des gens considèrent l'eau de consommation comme la principale source d'infections dues à l'eau, les éclosions causées par des contacts avec de l'eau de récréation ont augmenté dans les 30 dernières années aux États-Unis. La baignade dans des lacs, des plages et des étangs contaminés ainsi que les jeux dans les pataugeoires et les fontaines d'eau peuvent donc résulter en des infections extra-intestinales. Les résumés suivants présentent une liste de plusieurs pathogènes responsables d'infections liées à l'eau ainsi que leurs caractéristiques.

2.1 Pathogènes historiques

Salmonella fait partie des trois principales classes de bactéries pouvant occasionner des infections entériques au Canada (LCDC, 1998). Responsable d'environ 627 000 cas par année au Canada (Ng *et al.*, 1997), *Salmonella* est caractérisée par une faible dose infectieuse (100 à 1000 organismes) et un taux de survie prolongé dans l'environnement. Cette bactérie est principalement associée avec des infections dues à l'ingestion de nourriture contaminée, mais plusieurs éclosions pour lesquelles la route de transmission primaire était l'eau ont aussi été rapportées (Angulo *et al.*, 1997). L'espèce *S. typhi* est la plus connue des *Salmonella* et cause la fièvre typhoïde dont les symptômes sont la fièvre, les maux de tête et la diarrhée. Les infections à *S. typhi* peuvent être sévères et même mener à la mort lorsqu'il y a septicémie. La fièvre typhoïde fait beaucoup de victimes dans les pays en voie de développement, mais peu dans les pays développés.

Vibrio cholerae est une bactérie que l'on peut retrouver dans l'eau partout à travers le monde, mais qui cause des infections principalement dans les pays en voie de développement et dans les zones qui n'ont pas d'installations sanitaires adéquates. L'infection se traduit par une diarrhée abondante, indolore pouvant aboutir rapidement à une déshydratation sévère et à la mort du sujet si le traitement n'est pas administré rapidement. En 2004, plus de 100 000 cas et 2000 décès ont été recensés dans le monde et on suppose qu'il ne s'agit que de 5 à 10 % des cas totaux (OMS, 2005).

2.2 Pathogènes émergents

Une bactérie responsable de plusieurs cas de gastro-entérites au Canada est *Campylobacter* (*C. jejuni* et *C. coli*), bactérie pouvant causer des diarrhées sanguinolentes et de la fièvre chez plusieurs hôtes différents, dont l'être humain. Bien que les infections à *Campylobacter* se contractent surtout par ingestion de nourriture contaminée au Canada, une éclosion due à la présence de *C. jejuni* et de la bactérie *Escherichia coli* O157:H7 a résulté en l'infection de plusieurs personnes à Walkerton en Ontario pendant l'année 2000 (O'Connor, 2002).

Les souches pathogènes de *Escherichia coli*, particulièrement le sérotype O157:H7, sont connues pour être responsables de plusieurs infections liées à la consommation d'eau contaminée en Amérique du Nord. Les *E. coli* O157:H7 causent une sévère diarrhée sanguinolente et des complications peuvent mener au syndrome hémolytique urémique (SHU). Cette complication est caractérisée par une déficience rénale aiguë et une anémie hémolytique et peut s'avérer fatale, surtout chez les jeunes enfants. À Walkerton, en Ontario, sept personnes sont décédées et 2300 autres ont été malades suite à l'ingestion de cette bactérie ainsi que de *C. jejuni* (O'Connor, 2002).

La bactérie *Shigella sonnei* est également reconnue pour causer des infections après ingestion d'eau contaminée. Malgré le fait qu'elle ne soit pas associée à un taux de mortalité élevé, la faible dose infectieuse ainsi que sa capacité à survivre jusqu'à 3 jours dans l'eau démontrent l'importance de détecter *S. sonnei* dans l'eau de consommation.

Plusieurs infections liées à *S. sonnei* ont été recensées à travers le monde dont une éclosion, en 1995 dans l'Idaho (États-Unis), ayant résulté en l'infection de 82 personnes (CDC, 1996).

Cryptosporidium est un parasite intestinal dont la transmission s'effectue par ingestion d'eau ou de nourriture contaminées. Communément trouvé dans l'eau de surface et l'eau souterraine à travers le monde, il est associé au plus grand nombre d'infections liées à une éclosion dans l'histoire des États-Unis. En effet, en 1993, un nombre estimé de 403 000 personnes ont été infectées par *Cryptosporidium* à Milwaukee au Wisconsin (Mackenzie *et al.*, 1994). L'espèce *C. parvum* provoque un taux d'infections allant de 0.6 à 2% dans les pays développés (LCDC, 1998).

Le parasite responsable du plus grand nombre d'infections intestinales dans le monde est *Giardia lamblia* et il est spécialement retrouvé chez les enfants des pays en voie de développement (Gardner and Hill, 2001). Généralement associée avec une consommation d'eau non-filtrée ou avec une chloration inadéquate, *G. lamblia* peut survivre pendant une période de temps prolongée (plus de 77 jours) à basses températures, mais est sensible aux températures extrêmes (congélation ou ébullition) (Schaefer, 1999).

Les infections à *Entamoeba histolytica* surviennent partout à travers le monde et sont la troisième cause de décès dû à une infection parasitaire. Capable de survivre dans l'eau et la nourriture, ce parasite est transmis principalement par l'eau et l'utilisation de fèces humaines comme fertilisants dans les pays en voie de développement. L'infection peut très bien être asymptomatique dans un cas et mortelle dans l'autre.

Plusieurs pathogènes sont considérés comme des organismes aquatiques indigènes (pathogènes environnementaux) et ne se retrouvent normalement qu'en très faible nombre dans les systèmes de consommation d'eau potable. Cependant, comme ils sont capables de se multiplier dans l'eau, ils constituent une menace pour la santé humaine si leur nombre augmente dans les systèmes de distribution. Un de ces

pathogènes est *Legionella* spp. dont l'espèce *L. pneumophila* est responsable du plus grand nombre d'infections (Lemarchand, Masson, and Brousseau, 2004). Dans les eaux naturelles, *Legionella* spp. n'est considéré comme une source potentielle d'infections que si l'eau atteint des températures de 30°C à 40°C et occasionnellement jusqu'à 60°C (Lemarchand, Masson, and Brousseau, 2004). Lorsqu'il est introduit dans les systèmes de distribution d'eau potable, *Legionella* spp. peut croître dans l'eau chaude ou froide (chauffe-eau, spa, piscine, tour de refroidissement) et il peut survivre jusqu'à plusieurs années dans l'eau stérile. Un autre pathogène environnemental est *Pseudomonas aeruginosa*, qui est aujourd'hui le plus important pathogène opportuniste causant des infections nosocomiales chez les patients dont le système immunitaire est affaibli. *P. aeruginosa* peut être trouvé dans l'eau exposée à la pollution fécale, comme de l'eau de surface près d'un écoulement d'eau usée, et dans la terre. Cette bactérie peut créer des biofilms et croître dans les têtes de douches, les éviers et les drains où il y a de l'eau stagnante (Szewzyk *et al.*, 2000).

Le nombre de virus connus induisant un risque potentiel pour la santé et associés avec l'ingestion d'eau contaminée se situe au-delà d'une centaine (Pulg *et al.*, 1994). Une étude a déjà démontré qu'approximativement 20 millions de cas d'infections et environ 2000 décès liés à la présence de virus dans l'eau sont observés dans le monde en une année (Bennett, Homberg, and Rogers, 1987). Transmis surtout par contact direct entre personnes et par l'ingestion d'eau et de nourriture contaminées, les virus sont à craindre dû à leur capacité à résister aux traitements généraux de désinfection de l'eau ainsi qu'à leur potentiel de créer des problèmes chroniques beaucoup plus sévères qu'une infection gastro-intestinale (Rose, 1997). Les principaux virus pouvant se contracter par ingestion d'eau sont : le virus de Norwalk, l'hépatite A et E, les rotavirus et les adénovirus.

3.0 Sources des pathogènes dans les milieux aquatiques naturels

L'agriculture peut contribuer à l'apport de pathogènes dans l'eau par l'épandage de fumier de bétail sur les champs, des accès directs à des cours d'eau ainsi que l'écoulement à partir des parcs d'engraissement, des installations d'entreposage de fumier, des basses-cours de même que les pâturages des animaux. Le fumier n'est généralement pas traité pour réduire les pathogènes avant d'être étendu sur les champs, ce qui peut provoquer un lessivage des pathogènes vers les cours d'eau lors de fortes pluies et même une contamination des eaux souterraines. La texture du sol, la pente du terrain, la proximité des sources d'eau et l'intensité des précipitations avant et après l'application sont des facteurs qui influencent le taux de pathogènes dans l'eau (Goss *et al.*, 2001). Ceux-ci peuvent être transportés par les lessivages de surface, les écoulements par le système d'irrigation et les eaux souterraines ou bien ils peuvent rester emprisonnés à l'intérieur du sol. La fonte des neiges crée également un apport important de pathogènes dans les cours d'eau.

Les stations de traitement des eaux usées sont également des sources potentielles de micro-organismes pathogènes dans l'eau. Une station de traitement des eaux usées de la ville de Montréal traitant 7.6 millions de mètres cubiques par jour a été testée pour son efficacité à éliminer les pathogènes dans l'eau et les résultats ont été décrits dans une étude antérieure (Payment, Plante, and Cejka, 2001). L'efficacité de suppression des pathogènes était de 25 % pour les coliformes fécaux, 27 % pour *Cryptosporidium*, 76 % pour *Giardia* et 0 % pour les virus entériques. Les rejets de pathogènes dans une eau dite «traitée» sont donc relativement importants. Dans une autre étude, il a été démontré que des concentrations plus élevées d'oocystes de parasites ont été trouvés en aval des villes comparativement à des échantillons prélevés en amont (Chauret, Springthorpe, and Sattar, 1999). Le traitement inadéquat des eaux usées, des bris dans les réseaux de distribution et de mauvaises méthodes d'élimination des déchets sont donc des facteurs contribuant à augmenter la concentration de pathogènes dans les cours d'eau près des sites urbains.

En Amérique du Nord, la fréquence élevée de systèmes d'égouts sanitaires-pluviaux combinés peut également être un problème. La totalité des eaux usées des égouts combinés est dérivée vers les stations d'épuration par temps sec, par contre, lors d'orages de forte intensité, une partie des eaux pluviales et des eaux usées peut être dirigée directement dans les rivières ou les fleuves. Cela crée une certaine inquiétude pour la santé, car ces eaux usées se déversent dans des eaux de baignade et même de consommation, et contiennent des micro-organismes qui peuvent s'avérer dangereux pour l'humain. Aux Etats-Unis, environ 40 millions de personnes résident dans des villes comportant des systèmes combinés et un total estimé à 3000 milliards de litres d'eaux usées sont déversés dans des cours d'eau annuellement (Tibbetts, 2005). Le nombre de maladie gastro-intestinales résultant de ces déversements est évalué à 3500 à 5500 cas chaque année (Tibbetts, 2005). De tels systèmes se retrouvent également dans plusieurs villes au Canada, dont Montréal.

Les animaux sauvages peuvent également porter des pathogènes divers et être responsables de la contamination de certaines zones naturelles, éventuellement drainées vers les cours d'eau (Heitman *et al.*, 2002). Dans certaines régions, de nombreux oiseaux comme des canards et des oies sauvages sont présents sur les lacs et les plages, et leurs déjections sont une importante source de contamination de ces sites (Edge and Hill, 2005; Fogarty *et al.*, 2003).

Les activités aquatiques récréatives peuvent aussi être une source de micro-organismes pathogènes dans les sources d'eau. Bien qu'il soit prouvé que le contact du corps humain avec l'eau durant la baignade peut contribuer à augmenter les concentrations de pathogènes, la magnitude de l'impact des autres activités récréatives aquatiques n'est pas bien connue (Anderson *et al.*, 1998). Les bateaux de pêches et de plaisance sont autant de sources de contamination fécale si les déchets des occupants sont déchargés dans l'eau environnante (Sobsey *et al.*, 2003).

4.0 Indicateur de contamination fécale de l'eau

Représentant plus de 90 % des coliformes fécaux, *E. coli* est considéré comme l'organisme indicateur spécifique de pollution fécale de l'eau (Lemarchand, Masson, and Brousseau, 2004). Sa détection dans l'eau reflète donc la présence possible de plusieurs micro-organismes pathogènes d'origine entérique. Bien que *E. coli* puisse survivre jusqu'à trois mois dans une eau naturelle non-traitée (Edberg *et al.*, 2000), il est très sensible à la chloration, étant inactivé par des concentrations de chlore résiduel libre variant de 0.2 à 1.0 mg/L (Chalmers, Aird, and Bolton, 2000; Rice, Clark, and Johnson, 1999). Si certaines bactéries n'ont pas été inactivées ou détruites par la chloration, elles peuvent survivre pendant quelques jours dans le réseau de distribution, sans toutefois proliférer (McMath and Holt, 2000). Les normes au Canada déclarent que l'eau de consommation doit n'avoir aucun *E. coli* par 100 mL (0 unité formatrice de colonies (UFC) / 100 mL) tandis que l'eau de baignade ne doit pas contenir plus de 200 UFC / 100 mL (SC, 2005). La distinction entre les souches pathogènes et non-pathogènes de *E. coli* n'est toutefois pas utilisée dans ces tests.

5.0 La bactérie *Escherichia coli*

5.1 Historique

La bactérie *Escherichia coli* a été décrite en 1885 par Theodore Escherich comme étant un bâtonnet Gram-négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* (Donnenberg, 2002). Coliforme thermotolérant et hôte commun de la microflore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud, il colonise le tractus gastro-intestinal quelques heures seulement après la naissance et joue un rôle important dans le maintien de la physiologie de l'intestin (Bettelheim, 1986). *E. coli* constitue dès lors l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin. La majorité des souches de *E. coli* de l'intestin sont commensales, c'est-à-dire qu'elles sont non-pathogènes et coexistent en harmonie avec leur hôte. La présence de ces bactéries est même bénéfique pour l'homme dans la mesure où elles synthétisent de nombreux cofacteurs et contribuent à la résistance contre la colonisation du tractus gastro-intestinal par d'autres micro-organismes pathogènes (Donnenberg, 2002). Il est à noter que certaines souches a priori non-pathogènes peuvent amener des problèmes de santé chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli et sont une cause majeure d'infections nosocomiales (Janda and Abbott, 1998).

Dès 1897, Lesage a révélé que le sérum prélevé d'un cas de diarrhée aiguë agglutinait les organismes d'autres cas d'une même épidémie, mais pas les organismes d'enfants sains (Gyles, 1994). Cette constatation a mené à un postulat sur l'existence de souches pathogènes et non-pathogènes de *E. coli* et par la suite, nombre d'efforts furent déployés pour isoler et identifier les souches associées aux infections. Le concept de souches pathogènes fut finalement prouvé lorsque Bray, en 1945, isola des souches diarrhéiques de *E. coli* (maintenant appelées *E. coli* entéro-pathogéniques ou EPEC) lors d'une flambée dévastatrice de cas de diarrhées chez de très jeunes enfants (Gyles, 1994). Kauffman, en 1947, publia une première classification des différentes souches de *E. coli* en sérotypes basée sur les antigènes des lipopolysaccharidiques (O), flagellaires (H) et capsulaires (K). La situation est devenue plus complexe avec la découverte et la

caractérisation des facteurs de virulence ce qui a amené une nouvelle classification en pathotypes. Le terme « *E. coli* entéropathogénique » fut le premier à être introduit, en 1955, pour décrire les souches de *E. coli* impliquées dans les épidémies de diarrhées infantiles. Depuis, la capacité d'acquisition de nouveaux supports génétiques de facteurs de virulence (plasmides, bactériophages, éléments transposables, îlots de pathogénicité, ...) a permis l'émergence de souches avec des propriétés nouvelles capables de s'adapter à plusieurs types d'écosystèmes. Deux principaux types de syndromes cliniques peuvent résulter d'une infection avec un des pathotypes de *E. coli* : infections entériques et diarrhéiques (dites intestinales) et les infections extra-intestinales (tractus urinaire, méningite ou septicémie). Aujourd'hui, *E. coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié : en effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) en font un outil d'étude particulièrement apprécié des laboratoires de biologie moléculaire. Les génomes de quatre souches distinctes (K12 non-pathogène (Blattner *et al.*, 1997), EDL 933 avec pathotype EHEC (Perna *et al.*, 2001), Sakai pathotype EHEC (Hayashi *et al.*, 2001) et CFT073 pathotype UPEC (Welch *et al.*, 2002)) ont été séquencés, ce qui augmente encore le bagage de connaissances qui peut être récolté sur les interactions hôte-pathogène entre *E. coli* et les divers tissus qu'il peut infecter.

5.2 Épidémies associées à la nourriture

Malgré le fait que la pathogénicité de *E. coli* ait été reconnue il y a plusieurs dizaines d'années, leur impact n'a frappé le public que vers 1980, lorsque sont apparues deux épidémies de colites hémorragiques sévères aux États-Unis suite à la consommation de hamburgers insuffisamment cuits provenant d'une chaîne de restauration rapide (Riley *et al.*, 1983). Une souche de *E. coli* d'un nouveau sérotype, O157:H7, a été mise en évidence dans les selles des malades et dans la viande de bœuf d'où provenaient les hamburgers. Peu de temps après, une étude menée sur des selles d'enfants atteints par le syndrome hémolytique urémique (SHU) montra la présence de cette même souche de *E. coli*. Depuis cette date, des épidémies importantes consécutives à la consommation d'aliments contaminés par des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)

sont survenues dans le monde, les plus graves ayant causées plusieurs décès, principalement chez les gens dont le système immunitaire était affaibli. Les plus touchés étant notamment les enfants, la présence potentielle de O157 :H7 dans la nourriture a généré une vive inquiétude et est vite devenue un problème important en santé publique. Il est à noter que les O157 :H7 ne possèdent pas certaines caractéristiques standards des *E. coli* : ils ne poussent pas à la température sélective de 44.5°C et ils sont négatifs pour l'activité de la β -glucuronidase (Doyle and Schoeni, 1984; Raghubeer and Matches, 1990).

5.3 Épidémies associées à l'eau

Pour ajouter encore à l'impopularité de *E. coli*, particulièrement O157 :H7, plusieurs éclosions sont survenues au cours des dernières années impliquant une consommation d'eau contaminée. Dès 1975, plus de 2000 personnes fréquentant un parc national aux États-Unis ont été infectées par une souche de *E. coli* entérotoxigénique (ETEC) suite à la consommation d'une eau dont la concentration en chlore résiduel était insuffisante en bout de réseau (Rice *et al.*, 1999). La première épidémie due à la présence de *E. coli* O157 :H7 dans l'eau de consommation a été rapportée au début des années 90 dans une petite municipalité de 3000 habitants au Missouri. Attribuée à l'infiltration d'eau contaminée dans le système d'aqueduc, cette épidémie a affecté 243 personnes, dont 32 ont dû être hospitalisées, et causé quatre décès (Swerdlow *et al.*, 1992). Par la suite, trois épidémies causées par la présence de *E. coli* O157 :H7 dans l'eau de consommation ont été particulièrement médiatisées. La première eut lieu au Wyoming et a affecté 157 personnes en 1998 (Olsen *et al.*, 2002); la seconde a rendu près de 1000 personnes malades et a causé deux morts dans l'état de New York en 1999 (CDC, 1999); et la troisième en Ontario a causé sept morts et fait 2300 malades en 2000 (O'Connor, 2002). Cette dernière éclosion est survenue suite à la contamination de l'un des puits municipaux par des déjections de bovins.

E. coli peut aussi être la cause d'infections suite à un contact physique direct avec de l'eau de baignade contaminée. En 1991, dans la ville de Portland en Oregon, 59

personnes ont été infectées après avoir eu un contact direct avec l'eau (Keene *et al.*, 1994). Plus près de chez nous, à Montréal, quatre cas de *E. coli* O157:H7 ont été déclarés. Les malades avaient entre trois et sept ans, et ils s'étaient tous baignés à une plage publique de la région qui avait peu de commodités hygiéniques (Agence de Santé Publique du Canada, 2004).

6.0 Les pathotypes entériques de *E. coli*

À la différence des souches commensales, les souches pathogènes possèdent des gènes de virulence qui leur permettent de créer une large variété d'infections chez les mammifères incluant l'homme (Donnenberg, 2002). La diversité et la combinaison des gènes de virulence associés aux *E. coli* déterminent la spécificité de l'hôte ainsi que la nature de l'infection. Ce sont ces propriétés distinctes de virulence et les symptômes cliniques de l'hôte qui déterminent le pathotype.

6.1 Les *E. coli* entéro-pathogéniques (EPEC)

Les EPEC sont responsables des gastro-entérites épidémiques et sporadiques chez l'humain de même que chez l'animal, principalement dans les pays en voie de développement. Transmise surtout par contact direct entre personnes et non par eau ou nourriture contaminées, l'infection par les EPEC touche majoritairement les enfants de moins de deux ans (Nataro and Kaper, 1998). Cependant, lors d'ingestion d'un grand nombre d'organismes, des problèmes entériques peuvent survivre chez des adultes en bonne santé. La maladie se caractérise par une diarrhée aqueuse aiguë et persistante ainsi que des vomissements et une légère fièvre (Nataro and Kaper, 1998). Les réservoirs des EPEC sont les enfants symptomatiques et asymptomatiques, de même que les adultes porteurs sains. En effet, des études épidémiologiques effectuées dans plusieurs pays ont démontré que jusqu'à 20 % des enfants en santé de moins de deux ans peuvent être porteurs d'EPEC (Levine and Edelman, 1984). Des infections peuvent également être causées par des EPEC atypiques, c'est-à-dire qui ne possèdent pas le plasmide EAF (pour EPEC adherence factor) et donc, qui n'ont pas le gène *bfpA* (Robins-Browne *et al.*, 2004). Une variété d'antibiotiques sont utilisés pour traiter les infections à EPEC et, malgré leur utilité dans plusieurs cas, la multirésistance (résistance à plus de trois agents antimicrobiens) est commune chez les EPEC (Nataro and Kaper, 1998).

6.2 Les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC)

Reconnus pour la première fois comme agent causal de la diarrhée chez les porcelets, les ETEC sont aussi responsables, dans les pays en voie de développement, de la diarrhée aqueuse chez les jeunes enfants (Janda and Abbott, 1998). Également contractés par des adultes voyageant dans des pays chauds et humides (« diarrhée du voyageur » ou « turista »), les ETEC se transmettent surtout lors de la consommation d'eau ou de nourriture contaminées. Ils représentent 20 à 40 % des cas de diarrhées chez les voyageurs et entraînent une forte déshydratation de la personne infectée (Nataro and Kaper, 1998). Bien que les agents antimicrobiens soient efficaces pour réduire les symptômes, l'émergence de souches d'ETEC résistantes est un problème dans plusieurs régions. Heureusement, la thérapie de réhydratation orale est souvent suffisante pour sauver les enfants atteints.

6.3 Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)

Version évoluée des EPEC, les EHEC sont principalement reconnus du grand public par le sérotype O157:H7, responsable de la « maladie du hamburger » rapportée pour la première fois en 1983 (Riley *et al.*, 1983). Les victimes d'EHEC ont peu ou pas de fièvre et souffrent de douleurs abdominales ainsi que de diarrhées hémorragiques (colite hémorragique). Dans la plupart des cas, la diarrhée se résorbe sans séquelle, mais chez environ 10 % des malades de moins de dix ans ainsi que plusieurs personnes âgées, la maladie évolue en syndrome hémolytique urémique (SHU) (Nataro and Kaper, 1998). De ces patients, 3 à 5 % mourront et entre 12 et 30 % garderont des séquelles sévères incluant des troubles rénaux et neurologiques. Les EHEC sont transmis par de la nourriture ou de l'eau contaminées de même que de personne à personne. La plupart des cas proviennent de l'ingestion de viande de bovin, les EHEC pouvant coloniser le tractus intestinal de 10 à 25 % de ces animaux sans toutefois les rendre malades (Nataro and Kaper, 1998). Les autres sources de nourritures à l'origine de colites hémorragiques dues aux EHEC sont le mouton, le porc, les oiseaux sauvages, le cheval, le cerf, le lait cru, les pousses de radis, la mayonnaise, le jus de pomme non-pasteurisé et le salami

fermenté. Ces derniers items démontrent la capacité notable de O157:H7 à croître dans des milieux à pH acides (jusqu'à pH 3.4 pendant plusieurs jours) où d'autres pathogènes n'auraient pu survivre. Les sources d'eau, incluant l'eau de baignade, l'eau de puits et les systèmes municipaux de transport des eaux, ont également été impliquées dans plusieurs épidémies de EHEC. Bien que les EHEC soient susceptibles aux agents antimicrobiens, il n'y a aucune étude qui démontre de façon concluante que l'utilisation de tels agents ait altéré l'issue de la maladie (Nataro and Kaper, 1998).

6.4 Les *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC)

Les EAEC sont responsables d'épidémies de diarrhées persistantes (plus de 14 jours) chez les enfants des pays en voie de développement et causent des épidémies sporadiques dans les pays développés. La particularité de ces bactéries est de former des agrégats lors de leur attachement aux cellules de l'intestin. La majorité des épidémies sont associées à la consommation de nourriture de restaurant, mais aucune source unique n'a pu être identifiée. Ce groupe est hétérogène au niveau des symptômes. Un tiers des enfants colonisés par des EAEC ont des diarrhées sanglantes et du mucus est présent occasionnellement tandis certains adultes atteints ont plutôt une fièvre, des vomissements et de la douleur abdominale (Janda and Abbott, 1998). La plupart des enfants touchés par une diarrhée causée par des EAEC nécessitent une hydratation intraveineuse. Il est intéressant de noter que de nombreux EAEC sont multirésistants (Nataro and Kaper, 1998).

6.5 Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC)

Les EIEC sont des bactéries apparentées à *Shigella* spp. d'un point de vue biochimique, génétique et pathogénique. Elles possèdent également le même mécanisme d'invasion des cellules épithéliales de l'intestin. Les études décrivent surtout des épidémies de EIEC et non des cas sporadiques, ceux-ci étant probablement faussement considérés comme des infections par *Shigella* spp. (Nataro and Kaper, 1998). Les infections par des EIEC sont rares dans les pays développés, bien que certaines

éclosions occasionnelles par ingestion de nourriture contaminée aient eu lieu. Une infection par des EIEC résulte en une diarrhée aqueuse et, chez une minorité de patients, une dysenterie (diarrhée sanglante avec mucus). Spécifiques aux humains, les EIEC se transmettent par ingestion d'eau ou de nourriture contaminées et, bien que la transmission personne à personne soit possible, son incidence est faible due à la dose infectieuse élevée qui est nécessaire à l'infection.

6.6 Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Les DAEC se distinguent des EAEC par un phénotype d'adhésion diffuse sur les cellules intestinales et touchent principalement les jeunes enfants de un à cinq ans. Bien qu'il n'y ait que peu de connaissances sur les caractéristiques de la diarrhée causée par les DAEC, elle est généralement aqueuse et non-sanglante.

7.0 Les pathotypes extra-intestinaux de *E. coli* (ExPEC)

Malgré le fait que le public considère généralement *E. coli* comme une bactérie associée à une infection intestinale causant la diarrhée, la fréquence des infections dues aux ExPEC représente un sérieux sujet d'inquiétude pour la santé publique. En effet, des milliards de dollars en soins de santé, des millions de journées de travail et des dizaines de milliers de vies sont perdues chaque année dû aux infections par les ExPEC (Russo and Johnson, 2003). Ces bactéries font partie de la flore normale de l'intestin, mais sont des pathogènes opportunistes lorsqu'ils entrent en contact avec d'autres sites anatomiques (Johnson *et al.*, 2001). Les ExPEC sont principalement responsables d'infections urinaires, de septicémies, de méningites néonatales, d'infections intra-abdominales, de pneumonies nosocomiales et d'ostéomyélite (Johnson *et al.*, 2001).

7.1 Les *E. coli* uropathogènes (UPEC)

Les UPEC sont la cause du plus grand nombre d'infections du tractus urinaire, un groupe hétérogène de maladies incluant la cystite et la pyélonéphrite. Les infections urinaires sont la seconde cause, derrière les infections respiratoires, à provoquer une hospitalisation des patients (Russo and Johnson, 2003) et près de la moitié des femmes en souffriront avant le début de la trentaine (Foxman *et al.*, 2000). La cystite est une infection bénigne caractérisée par une difficulté à uriner et des douleurs au bas-ventre tandis que la pyélonéphrite est une infection impliquant les reins et causant des symptômes allant du malaise jusqu'à l'hospitalisation pour uro-septicémie (passage des bactéries des reins au sang) (Janda and Abbott, 1998). La transmission s'effectue par contamination du tractus urinaire par des matières fécales de même que par contact sexuel avec une personne infectée. Toute variation de la flore vaginale (notamment par utilisation de spermicides) facilite l'installation des UPEC et il n'est pas rare que ces infections impliquent des souches mutirésistantes aux agents antimicrobiens (Janda and Abbott, 1998).

7.2 Les *E. coli* septicémiques (SEPEC)

La présence de *E. coli* dans le sang (septicémie) doit toujours être considérée comme grave et se manifeste surtout chez de jeunes personnes ou adultes dont le système immunitaire est déjà affaibli (Mokady *et al.*, 2005). Souvent précédées par une infection du tractus urinaire ou par une infection respiratoire, les septicémies entraînent une hypotension et une dégénérescence irréversibles des organes vitaux. En 2000, les septicémies étaient la dixième cause de mortalité aux États-Unis (Russo and Johnson, 2003). Une estimation conservatrice indique que *E. coli* pourrait être responsable de 17 % des cas de septicémies sévères et avoir causé 40 000 morts aux États-Unis en 2001 (Russo and Johnson, 2003). De plus, dans les prochaines années, l'incidence des septicémies sévères de même que la mortalité devrait augmenter de 1.5% chaque année dû au vieillissement de la population (Angus *et al.*, 2001).

7.3 Les *E. coli* associés à la méningite (MNEC)

Les méningites causées par *E. coli* peuvent survenir à tous âges, mais sont particulièrement sérieuses chez les nouveau-nés (Janda and Abbott, 1998). *E. coli* est la cause la plus commune des méningites néonatales qui se développent chez un à cinq nouveaux-nés par 1000 naissances (Janda and Abbott, 1998). La transmission se fait généralement de la mère à l'enfant durant la naissance et occasionnellement des membres du personnel aux nouveau-nés dans les pouponnières. La mortalité des méningites à *E. coli* se situe aux environs de 31 % et les séquelles neurologiques, incluant des troubles de développement, surviennent chez 29 à 50 % des survivants (Janda and Abbott, 1998). Chez les adultes, les méningites causées par *E. coli* impliquent des personnes qui ont subi une intervention neurologique ou un traumatisme sévère à la tête.

8.0 Plasticité du génome de *E. coli*

Le génome de *E. coli* démontre une plasticité élevée, ce qui permet une perte ou un gain de gènes à une fréquence relativement élevée. Bien souvent, la présence de ces gènes a une nette influence sur la pathogénicité de la souche de *E. coli*. En effet, plusieurs gènes de virulence et de résistance aux agents antimicrobiens sont retrouvés sur des éléments génétiques mobiles tels des plasmides, des bactériophages et des îlots de pathogénicité. Ces derniers sont de larges blocs de gènes de virulence qui semblent insérés dans le chromosome, mais qui sont capables de délétions spontanées, surtout chez les UPEC (Johnson, 2003).

Cette plasticité du génome permet aux souches de *E. coli* de partager les facteurs de virulence entre elles à une fréquence élevée par dissémination horizontale et contribue à une évolution rapide de l'espèce (Korczak *et al.*, 2005). Cela permet également la formation de nouveaux pathotypes avec de nouvelles combinaisons de gènes de virulence qui augmentent l'aptitude de la souche à s'adapter à d'autres environnements. La situation se complique toutefois par l'observation que les îlots de pathogénicité peuvent être instables et subir une délétion du génome dans certains milieux, notamment à température de moins de 21°C (Middendorf *et al.*, 2004; Oelschlaeger *et al.*, 2002).

8.1 Les pathotypes non-standards

Étant donné la perte ou le gain de nombreux gènes de virulence par des échanges génétiques, de nombreux pathotypes non-standards sont apparus au fil des études (Korczak *et al.*, 2005). Pour les besoins de notre étude, nous avons classé certaines souches de *E. coli* dans une nouvelle catégorie nommée « ExPEC incomplets ». Ces souches portent des gènes reliés aux ExPEC, mais sans que l'on puisse attribuer un pathotype précis soit UPEC, MNEC ou SEPEC. Cette catégorie inclut les *E. coli* non-pathogènes qui ont acquis des gènes d'ExPEC par échanges génétiques afin de mieux survivre à l'intérieur de l'hôte (Johnson and Russo, 2002) de même que les UPEC avec

un profil incomplet dû à la délétion de gènes associés aux îlots de pathogénicité (Middendorf *et al.*, 2004).

Parmi les pathotypes non-standards, certains montrent des combinaisons inusitées de gènes de virulence acquis par échanges génétiques (Korczak *et al.*, 2005). En effet, certains gènes de pathotypes intestinaux (rarement les toxines des pathogènes entériques toutefois) peuvent se retrouver dans une souche extra-intestinale et inversement. Il est donc possible de postuler l'existence de nouveaux pathotypes qui débordent des pathotypes standards, mais qui ne sont pas encore reconnus cliniquement.

9.0 Groupes phylogénétiques

Utilisés pour déterminer la pathogénicité des souches de *E. coli*, les groupes phylogénétiques sont au nombre de quatre : A, B1, D et B2 (Clermont *et al.*, 2000). Dans notre étude, cette classification est basée sur la présence ou l'absence de trois gènes de *E. coli* soit *chuA* (un gène requis pour le transport du fer), *yjaA* (un gène dont la fonction est encore inconnue) et *tspE4.C2* (un fragment d'ADN codant pour une lipase). La plupart des souches commensales dérivent des groupes phylogénétiques A ou B1 tout comme les pathogènes responsables des diarrhées aiguës et sévères (ETEC, EHEC et EIEC) (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Les pathotypes liés à des diarrhées chroniques et moins graves (EPEC, EAEC, DAEC) sont distribués à travers les quatre groupes phylogénétiques. D'un autre côté, les ExPEC font principalement partie du groupe phylogénétique B2 et, dans une moindre proportion, au groupe D (Johnson *et al.*, 2002).

10.0 Biopuce d'ADN

La majorité des études sur la pathogénicité de *E. coli* utilisent le PCR (pour « polymerase chain reaction ») ou l'hybridation ADN-ADN comme méthodes de détection des différents pathotypes (Chern *et al.*, 2004; Lauber *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 1992; Muhldorfer *et al.*, 1996; Obi *et al.*, 2004). En dépit du grand nombre de gènes de virulence contenu dans le génome de *E. coli*, ces technologies contraignent à se limiter à la recherche d'un nombre restreint de ces gènes. Généralement, les gènes choisis sont dits « caractéristiques » d'un ou de quelques pathotypes, ce qui crée un biais et empêche de voir la présence de gènes inusités. Conséquemment, il est très facile pour une étude utilisant le PCR de manquer plusieurs pathogènes, particulièrement ceux qui ont des profils de virulence non-standards, ou de ne pas remarquer les combinaisons inusitées de gènes de virulence.

La technologie des biopuces d'ADN, quant à elle, offre le moyen le plus rapide et le plus pratique de détecter la présence ou l'absence d'une grande quantité de gènes de virulence en même temps. Pour une biopuce faite avec des oligonucléotides, ceux-ci sont d'abord déposés sur la surface de la lame. Ensuite, l'ADN d'une souche est marqué avec un marqueur fluorescent (dans notre cas le Cy5) et hybridé avec les sondes d'oligonucléotides de la puce. Le profil de fluorescence est lu par un détecteur puis analysé pour déterminer le pathotype de la souche. Les biopuces permettent une miniaturisation significative et donc la possibilité de mettre des milliers de sondes individuelles sur une même lame (Chizhikov *et al.*, 2001). Étant donné que tous les gènes de virulence connus de *E. coli* peuvent se retrouver sur la même puce, il n'y a aucun biais de recherche et les combinaisons inattendues de gènes de même que les pathotypes non-standards peuvent être détectés sans problème.

La biopuce utilisée pour nos recherches (Bruant *et al.*, 2006) compte près de 300 sondes représentant 183 gènes de *E. coli* reliés à la virulence ainsi que leurs variants, ce qui donne une image plus complète du profil de virulence des souches plutôt que de se limiter à une sélection restreinte de gènes. Pour obtenir une telle vue d'ensemble du

profil génétique d'une souche de *E. coli* et obtenir des résultats en triplicata comme avec la biopuce, il faudrait faire près de 900 PCR sur chaque souche. Il est évident que cela nécessiterait une somme d'argent et de travail substantielle. Conséquemment, les biopuces d'ADN constituent un outil puissant pour évaluer la plasticité du génome de *E. coli* et les transferts de gènes de virulence entre les souches, de même que pour découvrir de nouveaux pathotypes.

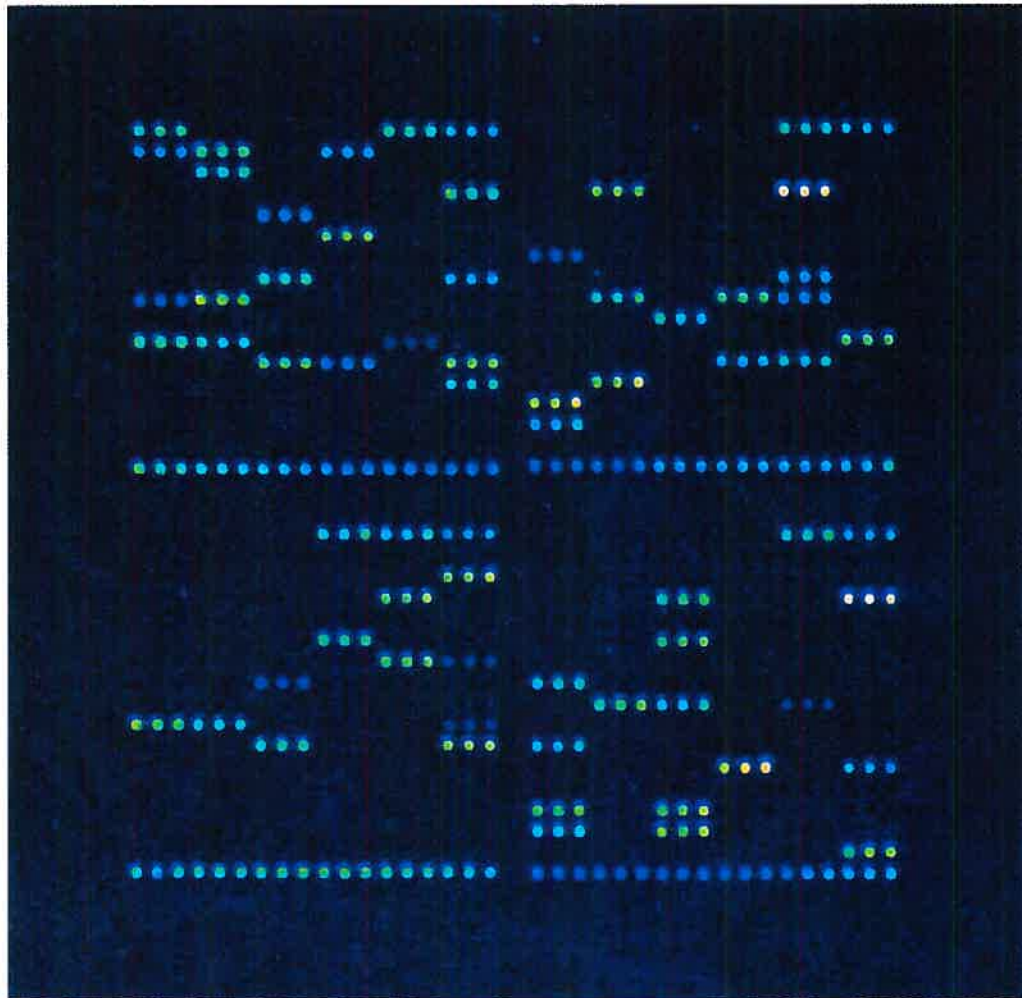


Figure 1 : Résultat d'un *E. coli* marqué et hybridé sur une biopuce d'ADN

11.0 La résistance aux agents antimicrobiens

Depuis la découverte de la pénicilline vers la fin des années 1920, l'utilisation d'agents antimicrobiens chez l'homme et chez l'animal a permis de réduire considérablement la mortalité associée à de nombreuses infections. Surtout employés pour combattre les infections chez l'être humain, les animaux et même les plantes, ils servent également à la préservation de certains composés biologiques et à la croissance de certains animaux. Cette utilisation importante a mené à une augmentation globale sans précédent de l'incidence des souches bactériennes résistantes à ces agents antimicrobiens. Maintenant considéré comme un problème émergeant à travers le monde et touchant autant la médecine humaine qu'animale, le phénomène de résistance bactérienne a été identifié et décrit pour tous les agents antimicrobiens connus. L'utilisation d'agents antimicrobiens amène en effet une sélection de la résistance chez les souches pathogènes et non-pathogènes de bactéries (Sayah *et al.*, 2005).

L'administration thérapeutique et sub-thérapeutique d'agents antimicrobiens chez l'animal suscitent l'intérêt public et scientifique, et seraient les causes de l'émergence, de la sélection et de la dissémination de la résistance bactérienne (Sayah *et al.*, 2005). Autrement dit, c'est l'utilisation répandue des agents antimicrobiens qui augmenterait la prévalence de la résistance à ces mêmes agents. Le manque d'informations ne permet toujours pas de conclure à un lien entre l'utilisation d'agents antimicrobiens chez l'animal et la dissémination de la résistance parmi les pathogènes humains, cependant on peut constater une contribution à la résistance des bactéries humaine par l'ingestion d'aliments d'origine animale (Witte, 1998). Ces bactéries peuvent coloniser l'intestin et transmettre leur résistance aux bactéries de la flore normale. En effet, les bactéries acquièrent des gènes de résistance par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les transposons et les intégrons et, une fois acquise, cette résistance peut facilement être transmise entre bactéries pour contribuer à l'émergence de souches résistantes (Sayah *et al.*, 2005). On note aussi une augmentation de la fréquence des gènes de résistance aux antibiotiques dans *E. coli* au cours d'une période de 20 ans (Maynard *et al.*, 2003).

En plus des conséquences sur la santé humaine, l'inquiétude est grandissante concernant la contamination des eaux de surface par des bactéries résistantes. Provenant des zones d'agriculture et d'élevage de bétail de même que d'eaux usées (Kasper and Burgess, 1990), les bactéries résistantes ont été retrouvées dans une variété de sources d'eau comme : les eaux usées domestiques, l'eau de consommation, les rivières et les lacs (McKeon *et al.*, 1995; Mulamattathil *et al.*, 2000).

Problématique

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie reconnue pour être une cause importante d'infections chez l'humain et ce, partout à travers le monde. Les souches de *E. coli* peuvent être divisées en trois groupes : souches commensales, souches pathogènes intestinales et souches pathogènes extra-intestinales. Les *E. coli* pathogènes sont classés en pathotypes sur la base de leur gènes de virulence distinctifs et des symptômes cliniques qu'ils causent chez leur hôte (Muhldorfer and Hacker, 1994). Malgré le fait que les infections par *E. coli* soient d'abord associées à une ingestion de nourriture contaminée, la contamination d'eau potable ou de récréation par certains pathotypes de *E. coli* a causé plusieurs épidémies menant parfois à la mort de certains malades. Un exemple récent est l'épidémie provoquée par la présence d'*E. coli* O157:H7 dans l'eau de consommation qui a causé 2300 cas dont sept morts à Walkerton (Ontario) en 2000 (O'Connor, 2003).

En dépit de cette menace inquiétante, très peu d'études ont été menées afin de déterminer la proportion de *E. coli* pathogènes dans l'eau et ces différentes études ont fait leur prélèvements d'eau de surface dans un seul site d'échantillonnage sans distinction du type de pollution environnante (Chern *et al.*, 2004; Lauber *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 1992; Muhldorfer *et al.*, 1996; Obi *et al.*, 2004). De plus, ces études utilisaient des méthodes de détection comme le PCR (Polymerase Chain Reaction) et l'hybridation ADN-ADN qui sont très limitantes puisqu'elles ne cherchent qu'un nombre restreint de gènes choisis. Cette présélection de certains gènes a pour conséquence que plusieurs pathogènes peuvent passer inaperçus. Les ExPEC (souches de *E. coli* causant des infections extra-intestinales) en sont un bon exemple puisque bon nombre de leurs gènes de virulence sont portés par des éléments génétiques mobiles comme les îlots de pathogénicité, les plasmides et les bactériophages.

Bien que le public considère généralement *E. coli* comme une bactérie responsable d'infections intestinales, les infections extra-intestinales par *E. coli* sont une source majeure de maladies, de mortalité et d'augmentation des coûts des soins de santé

(Russo and Johnson, 2003). Les ExPEC peuvent affecter divers sites anatomiques différents chez l'humain et causer plusieurs types d'infections : infections urinaires, méningite, septicémie, pneumonie, ostéomyélite. De plus, la résistance aux agents antimicrobiens s'est considérablement accrue chez les ExPEC au cours des dernières années. Dans les études portant sur les *E. coli* pathogènes présents dans l'eau, les ExPEC ont été particulièrement négligés et inclus dans une seule étude, où ils se retrouvaient en très forte majorité (Muhldorfer *et al.*, 1996).

Hypothèse

Étant donné le biais causé par la sélection de certains gènes de virulence précis dans les études antérieures portant sur la prévalence de *E. coli* pathogènes dans l'eau, il est impensable d'avoir un profil précis des gènes de virulence et de résistance aux agents antimicrobiens présents dans ces souches. Il est également impossible de discerner les souches au profil génétique inhabituel et, de ce fait, la proportion de pathogènes peut être grandement sous-estimée. Sur cette base, notre hypothèse est la suivante : l'utilisation d'une biopuce d'ADN permettant l'étude simultanée de plus de 180 gènes de virulence et 30 gènes de résistance aux antibiotiques (plus de 300 sondes) donnera un profil de virulence et de résistance aux agents antimicrobiens beaucoup plus complet et sans biais dû à une sélection de gènes. De plus, une proportion significative de *E. coli* pathogènes sera trouvée et des différences seront constatées selon la zone de prélèvement et de la pollution environnante.

Le premier objectif de notre étude consiste à prouver que les biopuces d'ADN sont un outil puissant et plus efficace que les méthodes de détection traditionnelles pour établir un profil de gènes de virulence et faire une classification des souches de *E. coli* en pathotypes. Pour ce faire, nous avons isolé et caractérisé, à l'aide de la biopuce, 300 souches de *E. coli* venant de trois sites d'échantillonnage dans le port de Hamilton (Ontario) et prélevées pendant deux saisons (printemps et été).

Le deuxième objectif de notre étude consiste à vérifier l'impact du type de pollution sur la pathogénicité et la résistance aux agents antimicrobiens des souches de

E. coli. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons isolé et caractérisé 300 souches de *E. coli* provenant de six écosystèmes aquatiques dans la région des rivières St-Clair et Détroit. Chacun de ces sites est touché par un type de pollution différent allant du site dit « propre » au site pollué par le milieu urbain, par l'agriculture ou par la présence d'une importante faune indigène.

SECTION II – Méthodologie et Résultats

Article I :

**A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a
high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* from
Great Lakes recreational waters**

(Applied and Environmental Microbiology, 2006, Vol. 72, p. 4200-4206)

Contribution à l'article I

Pour cet article, j'ai effectué la majeure partie du travail expérimental (marquage, hybridation, analyse et synthèse des résultats) et j'ai grandement participé à la rédaction de l'article lui-même.

A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* from Great Lakes recreational waters

Katia Hamelin^{1,2}, Guillaume Bruant³, Abdel El-Shaarawi⁴, Stephen Hill⁴, Thomas A. Edge⁴, Sadjia Bekal⁵, John Morris Fairbrother³, Josée Harel³, Christine Maynard¹, Luke Masson¹ and Roland Brousseau*^{1,2}

¹Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montreal, Quebec, CANADA H4P 2R2

²Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, 2900 boul. Édouard Montpetit, Montréal, Québec CANADA, H3T 1J4

³Groupe de recherche en maladies infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec CANADA J2S 7C6

⁴National Water Research Institute, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, Burlington, Ontario, CANADA L7R 4A6

⁵Laboratoire de Santé Publique du Québec, 20045, chemin Sainte-Marie
Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec CANADA H9X 3R5

* Corresponding author. Mailing address : Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montreal, Quebec, CANADA H4P 2R2. Phone: (514) 496-6152. Fax: (514) 496-6213. E-mail: [REDACTED]
[REDACTED]

Running title : Arrays find virulence genes in environmental *E. coli*

ABSTRACT

Escherichia coli is generally described as a commensal species with occasional pathogenic strains. Due to technological limitations, there is currently little information on the prevalence of pathogenic *E. coli* strains in the environment. For the first time, using a DNA microarray capable of detecting all currently described virulence genes together with commonly found antimicrobial resistance genes, a survey of environmental *E. coli* isolated from recreational water was carried out. Among 308 isolates from a beach site in the Great Lakes, a high proportion (29%) carried a pathotype set of virulence-related genes and 14% carried antimicrobial resistance genes, consistent with a potential risk for public health. Results also showed the presence of another 8% of isolates carrying unusual virulence gene combinations that would be missed by conventional screening. This new application of DNA microarrays to environmental waters will likely have important impact on public health, epidemiology and microbial ecology in the future.

INTRODUCTION

Until fairly recently, a common perception existed that pathogenicity traits in *Escherichia coli* were more the exception than the rule, *E. coli* being generally regarded as part of the normal lower intestinal flora (1, 14, 36, 39). However, an increasing number of categories of pathogenic *E. coli* have been identified over the past few decades, leading to the current situation where there are now at least 11 recognized pathotypes of *E. coli* in humans (19). Pathogenic *E. coli* strains are divided into pathotypes on the basis of their distinct virulence properties and the clinical symptoms of the host (26). Three main types of clinical syndrome can result from infection with one of these pathotypes: enteric and diarrheal diseases, urinary tract infections and sepsis/meningitis. *E. coli* pathotypes responsible for intestinal infections include: enteropathogenic (EPEC), enterohemorrhagic (EHEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroaggregative (EAEC), enteroinvasive (EIEC), diffusely adherent (DAEC), necrotoxic (NTEC) and cell-detaching (CDEC). Three additional *E. coli* pathotypes, collectively called ExPEC (34), are responsible for extraintestinal infections. ExPEC are composed of uropathogenic *E. coli* (UPEC) that cause urinary tract infections, neonatal meningitis-associated *E. coli* (MNEC) and strains that cause septicemia (SEPEC) (2, 19). These various pathotypes are defined by the presence of particular combinations of virulence and virulence-related genes; conversely, the pathotype of an uncharacterized strain can be inferred from its profile of virulence genes (19).

Even though pathogenic *E. coli* is primarily associated with food-borne diseases, contamination of drinking or recreational waters with some pathotypes has resulted in waterborne disease outbreaks and associated mortality. Recent examples in the Great Lakes area include pathogenic *E. coli* O157:H7 contributing to a drinking water outbreak in Walkerton, Ontario, in 2000 resulting in 2300 illnesses and 7 deaths (15), and to a recreational water outbreak in 2001 at a beach in Montreal, Quebec, resulting in the hospitalization of four children (4).

There are, however, few studies (6, 21, 22, 26, 28) where the proportion of pathogenic or potentially pathogenic *E. coli* in the environment has been determined. Furthermore, those studies dealing with virulence and virulence-related gene content have been limited in scope, generally looking for several characteristic genes defining a

few of the known pathotypes of *E. coli*, using classical detection methods such as DNA hybridization or Polymerase Chain Reaction (PCR). By using PCR, the search is inherently restricted to small specific pathotype gene subsets such as *hlyA*, *sfa*, *iroN*, *pap* and *cnf1* for UPEC (20, 25, 26, 42). Consequently, numerous other virulence genes can be overlooked.

With the advent of DNA microarrays, this technological limitation can now be overcome. The oligonucleotide microarray used in the present study carries more than 300 probes representing 189 virulence and virulence-related genes and 30 antimicrobial resistance genes (3), giving a much more complete picture of the virulence and antimicrobial resistance gene profiles present and not being limited by an *a priori* selection of PCR targets. *E. coli* were isolated from cultures of Lake Ontario recreational water samples and analyzed using the aforementioned *E. coli* pathotyping and antimicrobial gene typing microarray. Results showed that a substantial proportion (29%) of *E. coli* isolates from these recreational waters carry sets of virulence or virulence-related genes for one of the pathotypes, with a subset of these carrying antimicrobial resistance genes. This important representation of potential pathogens may have serious implications for public health.

MATERIALS AND METHODS

Water sampling and *E. coli* isolation. Water samples were collected in sterile 250 mL polypropylene bottles from Hamilton Harbor, Ontario, Canada, between May 10 and June 21, 2004 (spring) and between July 5 and August 23, 2004 (summer). Hamilton Harbor on Lake Ontario supports an active recreational environment with beaches, and offshore areas for windsurfing and boating, although beaches have been frequently closed in recent years as a result of high *E. coli* counts (27). While there is little agricultural influence in this urban area (population 640,000 in 2001), four municipal sewage treatment plants discharge into the harbor. Birds such as ring billed gulls and Canada geese also commonly frequent beach areas. Two replicate water samples were collected weekly at three water depths: 1) ankle depth at BayFront Park Beach; 2) offshore from BayFront Park Beach at a water depth of 6 meters (sampling 1 meter below the surface); and 3) further offshore in the middle of Hamilton Harbor at a water depth of 24 m (sampling 1 meter below surface). Water samples were filtered through 0.45 μ m membrane filters, and the filters were incubated overnight at 44.5°C on differential coliform agar supplemented with cefsulodin (Oxoid Inc.). Ten positive colonies from each water sample were randomly picked with a sterile toothpick and streak plated onto MacConkey agar (Difco Inc.) for overnight growth at 37°C. Putative *E. coli* isolates were tested for glucuronidase activity by growth and fluorescence in EC-MUG (Difco Inc.), and for indole production by growth in 1% (w/v) tryptone (Difco Inc.) and reaction with Kovac's reagent (Oxoid Inc.). Isolates positive for both tests were stored at -80°C in tryptic soy broth and 15% (v/v) glycerol. *E. coli* ATCC 29194 and *Klebsiella* ATCC 33495 were used as a positive and negative control respectively, during confirmation tests.

DNA extraction. *E. coli* isolates were grown overnight in 5 mL of tryptic soy broth at 37°C. Of this cell suspension, 1 mL was transferred to 1.5 mL centrifuge tubes and spun at 15,500 X *g* for 2 min. The supernatant was removed and the cell pellet resuspended in 200 μ L of sterile water with vortexing. The suspension was boiled for 10 min, centrifuged as before and 150 μ L of the supernatant containing DNA was removed for testing.

***E. coli* DNA labeling.** Bacterial DNA was labeled using Bioprime® DNA Labeling System (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario). Briefly, to remove any contaminating RNA, 2 µL of RNase A (10 mg/mL), (USB, Cleveland, OH, USA) was added to the genomic DNA sample for 2 min at 24°C and followed by centrifugation (15,500 X g, 2 min, 24°C). Four µL of the supernatant were added to a final volume of 50 µL containing 20 µL of a Random Primers Solution, 1 µL of high concentration DNA polymerase (Klenow fragment, 40 U/µL), 5 µL of a dNTP mix (1.2 mM dATP, 1.2 mM dGTP, 1.2 mM dTTP and 0.6 mM dCTP in 10 mM Tris pH 8.0 and 1 mM EDTA) and 2 µL of 1 mM Cy5-dCTP. Labeling reactions were performed in the dark at 37°C for 3.5 hours and stopped by addition of 5 µL Na₂EDTA 0.5M, pH 8.0. After adding 2.5 µL of 3M sodium acetate pH 5.2, the labeled samples were then purified with a PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The amount of incorporated fluorescent Cy5 dye was then quantified by scanning the DNA sample from 200 to 700 nm and subsequently inputting the data into the internet-based Percent Incorporation Calculator found at http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/percent_inc.html.

DNA microarray. The microarray used in this study is based on earlier published work (2) with the addition of more recently identified virulence-related genes and of the most common antimicrobial resistance genes found in Gram-negative bacteria (23). The current version carries 312 oligonucleotides of 70 bases long targeting 189 virulence or virulence-related genes and 30 antimicrobial resistance genes. The microarray also carries four positive controls for *E. coli* derived from the sequences of a tryptophanase (*tnaA*), a beta-glucuronidase (*uidA*), a lactose permease (*lacY*) and a beta-galactosidase (*lacZ*) encoding genes. Negative controls added on this microarray consist of oligonucleotides derived from the gene sequences for the green fluorescent protein of *Aequoria victoria* and the chlorophyll synthase from *Arabidopsis thaliana*. Validation and the details of the construction of the microarray were described recently (3).

Hybridization of labeled DNA. Microarrays were prehybridized at 50°C for 1 hour, under a 22 × 60 mm Hybri-slip (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) in a slide

Hybridization Chamber (Corning Canada, Whitby, Ontario), with 30 μ L of prewarmed DIG Easy HybTM buffer (Roche Diagnostics, Laval, Quebec) containing 5% (v/v) BSA (1 mg/mL) (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA). After prehybridization, the Hybri-slip was removed by dipping the slide in 0.1X SSC (15 mM NaCl and 1.5 mM trisodium citrate, pH 7.0), and the slide was dried by centrifugation at 800 X g for 5 min. Before hybridization, 1 μ g of labeled DNA was resuspended in 6 μ L of prewarmed DIG Easy HybTM buffer (Roche Diagnostics) and denatured by heating 5 min at 95°C. Microarrays were then hybridized overnight at 50°C, under 11 \times 11 mm Hybri-slips and in a slide Hybridization Chamber. After hybridization, the Hybri-slips were removed by dipping the slide in 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate, pH 7.2) and four stringency washes (three in 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS and one in 0.1X SSC) were performed at 37°C for 5 min under agitation. The slide was then air dried and scanned at a resolution of 10 μ m at 85% laser power, with a ScanArray® Lite fluorescent microarray analysis system (Perkin-Elmer, Mississauga, Ontario). Acquisition of fluorescent spots and quantification of fluorescent spots intensities were performed using the ScanArray Express® software version 2.1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). The data were normalized by subtracting the local background from the recorded spot intensities from one sub-array. For each sub-array, the median value of each set of triplicate spotted oligonucleotides was compared to the median value of all the sub-array. Oligonucleotides with a signal-to-noise fluorescence ratio greater than 2.0 were considered as positive.

Statistical analysis. Likelihood ratio test (18) was used to assess significance of comparative results under the binomial and multinomial models.

RESULTS

Water sampling and *E. coli* isolation. A total of 308 *E. coli* isolates were obtained from water samples collected weekly in the spring (May 10th to June 21st) and summer (July 5th to August 23rd) at three sites in Hamilton Harbor (Lake Ontario). Prominent fecal pollution sources within Hamilton Harbor include municipal wastewater and birds such as gulls and geese. Although there is little agricultural influence in this urban area (population 640,000 in 2001), four municipal sewage treatment plants discharge into the harbor area. Hamilton Harbor supports an active recreational environment with beaches and offshore areas for windsurfing and boating. One of the Hamilton Harbor beaches, BayFront Park Beach, has been frequently closed in recent years as a result of high *E. coli* counts (27). Earlier studies at BayFront Park Beach had suggested that the source of *E. coli* was more likely from the many ring billed gulls and Canada geese fecal droppings on the beach rather than from wastewater sources (9). The three sampling sites were 1) ankle depth water at BayFront Park Beach (110 isolates); 2) surface water at 6 meters depth offshore from the beach (99 isolates); and 3) surface water at 24 m depth further offshore in the middle of Hamilton Harbor (99 isolates). These sites represent different recreational water exposures for activities ranging from children bathing to adult windsurfing and boating.

Prevalence of *E. coli* isolates possessing virulence genes. Several isolates showed partial sets of virulence genes, particularly for the ExPEC pathotypes. It has been shown that ExPEC isolates can exist as commensals in the gut of healthy animals and humans (16), where they may gain or lose virulence genes through genetic exchanges, either individually or as pathogenicity islands (PAIs) (12, 24, 30). For the purposes of this study, we have defined incomplete ExPEC as *E. coli* isolates carrying ExPEC related-genes without being assignable to one of the three defined ExPEC classes, UPEC, MNEC or SEPEC. This category includes commensal *E. coli* possessing virulence genes which should have been acquired through genetic exchanges (16) and UPEC with incomplete pathogenic profile due to the absence of some genes associated to PAIs. Indeed, it has been shown that some UPEC genes located on PAIs are lost as the PAIs become unstable at a temperature lower than 21°C (24).

Our results showed a relatively high number and diversity of virulence and virulence-related genes in *E. coli* isolates from recreational waters (Table 1). Indeed, microarray hybridizations demonstrated that 29% of *E. coli* isolates possessed virulence genes related to a pathotype. Pathotype was attributed to *E. coli* samples according to their set of virulence genes or markers: EAEC (*capU*, *shf*, *virK*, aggregative adherence fimbriae encoding genes), ETEC (heat-stable and heat-labile toxin encoding genes, F4 and F18 fimbriae encoding genes), atypical EPEC (*espA*, *espB*, *tir*, *eae* and variants, absence of *bfpA*), UPEC (P pili encoding genes, *hlyA*, S fimbriae encoding genes, *chuA*, *fepC*, *cnf1*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *iroN*, *usp*), MNEC (*ibeA*, *neuA*, *neuC*), incomplete ExPEC (*kpsM*, *iutA*, *iucD*, *traT*, *malX*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *chuA*, *fepC*, *iss*, *kfiB*). In our study, most isolates possessing virulence genes were classified as ExPEC (26.4% of total *E. coli*) in contrast to a low proportion of *E. coli* of enteric pathotypes (2.2%). Within the ExPEC group, most isolates were classified as UPEC, a pathotype associated with urinary tract infections. Since the microarray carries all known virulence factors, numerous incomplete ExPEC were observed which would normally be missed in a PCR-based assay. Various unusual gene combinations were thus discovered, such as ExPEC pathogenic profiles with assorted ETEC genes like toxin exporter *leoA* or invasion protein *tia*. These unusual combinations provide evidence of genetic exchange between the various pathotypes (2). It is also surprising that we found almost as many isolates of MNEC (2.0%) as those of enteric pathotypes (2.2%), as MNEC is not a relatively common pathotype.

In this study, the method used to isolate *E. coli* strains from water was based on a high incubation temperature (44.5°C) and selection for β -glucuronidase activity. However, many studies have shown that isolates belonging to O157:H7 serotype do not grow at this temperature (8, 32, 40) and are also known to be glucuronidase-negative. For this reason, the frequency of *E. coli* isolates possessing virulence genes that we found is a minimum estimate. Although the prevalence of *E. coli* O157:H7 has been found to be low in surface waters (10, 17), it is quite possible that the proportion of pathogenic *E. coli* in our water samples could have been higher if our culturing methods had not excluded detection of O157:H7, and possibly other pathogenic *E. coli* strains.

Another interesting finding of our microarray study is the high genetic diversity among the *E. coli* isolates. We observed a very low frequency of identical microarray gene profiles for a given sampling date and even for the total set of *E. coli* isolates, except for one day. On that day, ten out of ten *E. coli* were ExPEC but with only four different virulence gene profiles. For one of these, five isolates shared an identical profile, thus possibly representing one clone.

Pathotype distribution according to the location and the season. Table 2 shows pathotype distribution in relation to the three sampling locations (ankle, 6 m depth and mid-harbor, 24 m depth) and the two seasons of sampling (spring, summer). No significant difference (using a binomial likelihood ratio test) was observed, with respect to the prevalence of *E. coli* isolates possessing virulence genes between the three locations as approximately similar numbers were found at ankle, 6 m depth or harbor (24 m depth). However, enteric *E. coli* pathotypes were only found in deeper waters.

The most striking observation from the data involved the temporal difference between spring and summer. As shown in Table 2, there is a significantly greater proportion of spring *E. coli* isolates carrying virulence genes (21% of total *E. coli*) than of summer isolates (8%) ($p < 0.0001$). The basis for these seasonal differences remains unclear. Since some local sewage treatment plants do not start chlorinating final effluents until mid-May, it is possible that the non-chlorinated effluents are contributing to the higher frequency and diversity of *E. coli* pathotypes in offshore harbor waters in the spring.

During spring, a higher diversity of pathotypes was noticed in the harbor (24 m) isolates as compared to those from 6 m depth, isolates from ankle depth showing the lowest diversity in (Table 2). This might reflect more diversity of *E. coli* carrying virulence genes in sewage treatment plant effluents entering the harbor waters than in bird feces at the beach. This situation was not seen during summer where profile diversity was similar between the three locations, possibly also reflecting a lower influence of *E. coli* from sewage treatment plant effluents which are mostly chlorinated at this time.

Prevalence of antimicrobial resistance genes. A total of 43 isolates, nearly 14% of the total number of *E. coli* analyzed, possessed at least one antimicrobial resistance gene (Table 3). Whereas half of the isolates containing antimicrobial resistance genes belonged to the ExPEC group, interestingly, the others were found distributed within the non-pathogenic group (*E. coli* isolates which do not possess any virulence gene or showing only a few scattered virulence-related genes).

Among the isolates carrying resistance genes, the most frequently found genes were *tet(A)* and *tet(B)* (respectively 5.2% and 2.6% of total *E. coli*), *bla_{TEM}* (4.9%), *aadA1* (4.9%), and *sulII* (4.2%) which code respectively for resistance to the tetracycline, ampicillin, streptomycin and sulfonamide families (detailed in Table 4). Another study obtained a similar distribution of antimicrobial resistance genes in animal feces, agriculture environment and human sewage (37). In our study, many of the *E. coli* that carried resistance genes showed the presence of a class 1 integron (4% of total) and also carried two or more antimicrobial resistance genes. More specifically, all multi-resistant *E. coli* (isolates carrying more than three antimicrobial resistance genes) and the majority of *E. coli* with three resistance genes were carrying a class 1 integron. Integrons, which can carry different antimicrobial resistance gene cassettes (23) , are known to be a very efficient genetic mechanism in the diffusion of antimicrobial resistance genes and in the dissemination of resistance among bacterial pathogens (5). Among the genes found in our isolates, streptomycin (*aadA1*), sulfonamide (*sulII*), chloramphenicol (*catI*) and trimethoprim (*dhfrI*, *dhfrVII*) resistance genes were those most frequently associated with class 1 integron, which agrees with other studies (23, 35, 38).

The occurrence of antimicrobial resistance genes in *E. coli* was significantly different ($p < 0.0001$) between water depths. Indeed, more than 50% of *E. coli* carrying resistance genes were found in the middle of the harbor in contrast to 35% at 6 m depth and only 9% at ankle depth (Table 3). The lower percentage of antimicrobial resistance genes in *E. coli* from ankle depth beach waters is consistent with these *E. coli* originating from bird droppings on the beach (9).

Variations were also noted between the spring and summer seasons (Table 3). Seventy-four percent of *E. coli* carrying resistance genes were found during spring as

compared to only 26% during summer ($p < 0.001$), although the diversity of resistance genes found was quite similar between the two seasons. This may also reflect a lower influence of *E. coli* from sewage treatment plant effluents in the summer, and reinforces the notion that the *E. coli* carrying resistance genes are mostly of human origin.

Avian fecal pollution on beach. In order to investigate the relation between pollution by wild birds and the three locations of sampling, the *tsh* gene was tested as an indicator of *E. coli* of avian source (7, 41). A difference in temporal and spatial distribution was observed among the 30 *E. coli* isolates positive for *tsh*. A greater number of *E. coli* isolates carrying the *tsh* gene were found during the spring (20 isolates) than during the summer (10 isolates), most of them being found near the beach (ankle depth = 13 isolates; 6 m depth = 10 isolates) rather than in the middle of the harbor (7 isolates), although the level of significance is not high ($p = 0.072$). Microarray data for *tsh* therefore seem consistent with antibiotic resistance analysis source tracking data and observations of many birds and their fecal droppings on the beach (9) indicating the importance of bird rather than human contamination of the beach waters.

DISCUSSION

The parallel processing power of DNA microarrays allowed us to accomplish the first comprehensive assessment of the presence of virulence and antimicrobial resistance genes in waterborne *E. coli* isolates. Using an oligonucleotide microarray capable of detecting 189 virulence genes and markers together with 30 commonly found antimicrobial resistance genes, a high percentage (29%) of *E. coli* isolates possessing virulence or virulence-related genes was found in recreational waters, along with a lower but significant number of isolates (14%) containing genes coding for antimicrobial resistance. Due to differences in methodology (PCR versus microarray), these numbers are difficult to compare with earlier published results. In an earlier PCR-based study done in recreational waters, a prevalence of 0.9% of pathogenic *E. coli* was found (21). Two other studies, one in raw surface water and the another from an agricultural waste lagoon, showed prevalence of *E. coli* isolates possessing virulence genes, at 10 and 7% respectively (6, 22). In contrast, two separate studies showed higher numbers of *E. coli* isolates possessing virulence genes, however, the sampling was done in very different environments. The first was conducted in a German river contaminated with communal sewage where 41% of the *E. coli* carried virulence markers, all being ExPEC (26). The second was carried out in a highly polluted South African river (29) where 68% of the *E. coli* were found to possess enteric virulence markers using PCR (28). Although both PCR and microarray methods are limited to determining genotype and not phenotype, these results nevertheless raise potential issues in public health. Additionally, it has been shown that the number of ExPEC virulence genes on a *E. coli* isolate is proportional to its pathogenic potential (31).

In spite of the large number of virulence gene-containing *E. coli*, PCR studies are technologically constrained to focusing on a limited number of pathotypes. In contrast, by virtue of its ability to detect all known virulence genes in parallel, DNA microarrays are inherently unbiased going beyond conventional molecular techniques in their ability to detect unexpected combinations of virulence genes. Consequently, our DNA microarray constitutes a new powerful molecular tool for i) the evaluation of the genome plasticity, by monitoring the transfer of virulence and antimicrobial resistance genes between *E. coli* strains, and ii) the identification of new pathotypes. Indeed,

virulence and antimicrobial resistance genes are mostly on plasmids, bacteriophages or pathogenicity islands. These genetic determinants contribute to the rapid evolution of *E. coli* strains and to the creation of new pathogenic variants since they are frequently subject to rearrangements, excision and horizontal transfer. The situation is further complicated by the observation that pathogenicity islands are unstable and can be deleted from the genome in the environment (12, 24). The information so obtained should prove valuable in areas ranging from microbial ecology and population dynamics to epidemiology.

With our microarray, we found high genetic diversity among the 308 environmental *E. coli* isolates tested, with evidence of genetic exchanges. Furthermore, in addition to demonstrating a high proportion of isolates carrying a full pathotype set of virulence-related genes, the microarray also identified other isolates carrying unusual virulence gene combinations. These unusual combinations would easily have been missed by conventional PCR tests. These may be commensal isolates which have acquired virulence determinants in order to better survive in the host. This is in agreement with other studies which showed that non-pathogenic commensal and probiotic *E. coli* isolates could harbour many virulence-associated genes or PAI-localized genes, supporting their survival and successful colonization of the host (11, 13). By trading virulence or virulence-related genes to improve their chances of survival, these *E. coli* isolates also appear to be disseminating antimicrobial resistance genes since a relatively high number of the resistant isolates were characterized as non-pathogenic with our microarray.

Pathotyping of *E. coli* present in water sources used for drinking or recreation could be an important tool in the development of strategies to better protect public health. Duplication in subsequent studies of the association of the presence of virulence and antimicrobial resistance genes with human wastewater found here could have an impact on the perceived need to achieve a high level of disinfection for wastewater treatment plant effluents. In terms of public health, it is also significant that a high percentage of ExPEC was found; these pathogens, which can also be part of the human and animal intestinal flora (16) are responsible for an estimated 40,000 deaths and annual expenditures of at least \$2.6 billion in the United States alone (33). Within the

ExPEC group, we found an abundance of UPEC, the main cause of urinary tract infections (25), a frequent reason for consultation with a general practitioner. Therefore, the data clearly indicates a need to better understand the public health implications of *E. coli* in recreational waters carrying virulence genes. Another microarray study is in progress in our laboratory to investigate the occurrence of virulence and antibiotic resistance genes in *E. coli* from three different other locations (pristine water, and waters impacted by agricultural and urban wastes).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded in part by the Canadian Water Network and Environment Canada. Jacqui Milne and Murray Charlton, NWRI, assisted with water sample collection.

REFERENCES

1. **Acalmo, I. E.** 1997. *Fundamentals of Microbiology*. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA.
2. **Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother, and J. Harel.** 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2113-2125.
3. **Bruant, G., C. Maynard, S. Bekal, I. Gaucher, L. Masson, R. Brousseau, and J. Harel.** 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for the detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3780-3784.
4. **Bruneau, A., H. Rodrigue, J. Ismael, R. Dion, and R. Allard.** 2004. Outbreak of *E. coli* O157:H7 associated with bathing at a public beach in the Montreal-Centre region. *Can. Commun. Dis. Rep.* **30**:133-136.
5. **Carattoli, A.** 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* **32**:243-259.
6. **Chern, E. C., Y. L. Tsai, and B. H. Olson.** 2004. Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:356-362.
7. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* **30**:299-316.
8. **Doyle, M. P., and J. L. Schoeni.** 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:855-856.
9. **Edge, T. A., and S. Hill.** 2005. Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Can. J. Microbiol.* **51**:501-505.
10. **Gannon, V. P. J., T. A. Graham, S. Read, K. Ziebell, A. Muckle, J. Mori, J. Thomas, B. Selinger, I. Townshend, and J. Byrne.** 2004. Bacterial pathogens in rural water supplies in southern Alberta, Canada. *J. Toxicol. Environ. Health A* **67**:1643-1653.

11. **Grozdanov, L., C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker, and U. Dobrindt.** 2004. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **186**:5432-5441.
12. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:641-679.
13. **Hejnova, J., U. Dobrindt, R. Nemcova, C. Rusniok, A. Bomba, L. Frangeul, J. Hacker, P. Glaser, P. Sebo, and C. Buchrieser.** 2005. Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83: K24: H31). *Microbiology* **151**:385-398.
14. **Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams.** 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 9 ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
15. **Hrudey, S. E., and E. J. Hrudey.** 2002. Walkerton and North Battleford--key lessons for public health professionals. *Can. J. Public Health* **93**:332-333.
16. **Johnson, J. R., and T. A. Russo.** 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *J. Lab. Clin. Med.* **139**:155-162.
17. **Johnson, J. Y. M., J. E. Thomas, T. A. Graham, I. Townshend, J. Byrne, B. Selinger, and V. P. J. Gannon.** 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in surface waters of southern Alberta and its relation to manure sources. *Can. J. Microbiol.* **49**:326-335.
18. **Kalbfleisch, J. G.** 1979. *Probability and statistical inference*, vol. 2. Springer-Verlag, NY.
19. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-140.
20. **Kuhnert, P., P. Boerlin, and J. Frey.** 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:107-117.
21. **Lauber, C. L., L. Glatzer, and R. L. Sinsabaugh.** 2003. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in recreational waters. *J. Great Lakes Res.* **29**:301-306.

22. **Martins, M. T., I. G. Rivera, D. L. Clark, and B. H. Olson.** 1992. Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal *o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside-4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3095-3100.
23. **Maynard, C., S. Bekal, F. Sanschagrin, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Lariviere, and J. Harel.** 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5444-5452.
24. **Middendorf, B., B. Hochhut, K. Leipold, U. Dobrindt, G. Blum-Oehler, and J. Hacker.** 2004. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J. Bact.* **186**:3086-3096.
25. **Morin, M. D., and W. J. Hopkins.** 2002. Identification of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction and their association with infectivity in mice. *Urology* **60**:537-541.
26. **Muhldorfer, I., and J. Hacker.** 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb. Pathog.* **16**:171-181.
27. **O'Connor, K. M.** 2003. Remedial action plan for Hamilton Harbour: stage 2 update 2002. Canada Centre for Inland Waters, Burlington, ON.
28. **Obi, C. L., E. Green, P. O. Bessong, B. Villiers, A. A. Hoosen, E. O. Igumbor, and N. Potgieter.** 2004. Gene encoding virulence markers among *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic stool samples and river sources in rural Venda communities of South Africa. *Water SA* **30**:37-42.
29. **Obi, C. L., N. Potgieter, P. O. Bessong, and G. Matsaung.** 2002. Assessment of the microbial quality of river water sources in rural Venda communities in South Africa. *Water SA* **28**:287-292.
30. **Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt, and J. Hacker.** 2002. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int. J. Antimicrob. Agents* **19**:517-521.

31. **Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion, and E. Denamur.** 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **67**:546-553.
32. **Raghubeer, E. V., and J. R. Matches.** 1990. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. *J. Clin. Microbiol.* **28**:803-805.
33. **Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* **5**:449-456.
34. **Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**:1753-1754.
35. **Sallen, B., A. Rajoharison, S. Desvarenne, and C. Mabilat.** 1995. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. *Microb. Drug Resist.* **1**:195-202.
36. **Salyers, A. A., and D. D. Whitt.** 2002. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*, 2 ed. ASM Press, Washington, DC.
37. **Sayah, R. S., J. B. Kaneene, Y. Johnson, and R. Miller.** 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1394-1404.
38. **Schmidt, A. S., M. S. Bruun, J. L. Larsen, and I. Dalsgaard.** 2001. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:735-743.
39. **Singleton, P.** 2004. *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*, 6 ed. Wiley, Chichester, NY.
40. **Thompson, J. S., D. S. Hodge, and A. A. Borczyk.** 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2165-2168.

41. **Tivendale, K. A., J. L. Allen, C. A. Ginns, B. S. Crabb, and G. F. Browning.** 2004. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh* with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **72**:6554-6560.
42. **Yamamoto, S., A. Terai, K. Yuri, H. Kurazono, Y. Takeda, and O. Yoshida.** 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**:85-90.

TABLE 1. Pathotype and antimicrobial resistance of all *E. coli* isolates

| Pathotype ^{a, b} | Number of isolates | |
|---------------------------|--------------------|--|
| | Total (%) | With antimicrobial resistance ^c (%) |
| ExPEC | | |
| - UPEC | 28 (9.1) | 4 (1.3) |
| - MNEC | 6 (2.0) | 2 (0.7) |
| - Incomplete ExPEC | 47 (15.3) | 11 (3.6) |
| SUBTOTAL : | 81 (26.4) | 17 (5.6) |
| Enteric <i>E. coli</i> | | |
| - EAEC | 5 (1.6) | 3 (1.0) |
| - ETEC | 1 (0.3) | 1 (0.3) |
| - Atypical EPEC | 1 (0.3) | 0 (0.0) |
| SUBTOTAL : | 7 (2.2) | 4 (1.3) |
| Non-pathogenic | 220 (71.4) | 22 (7.1) |
| TOTAL of <i>E. coli</i> : | 308 (100.0) | 43 (14.0) |

^a Pathotype was attributed to *E. coli* samples according to their set of virulence genes or markers: EAEC (*capU*, *shf*, *virK*, aggregative adherence fimbriae encoding genes), ETEC (heat-stable and heat-labile toxin encoding genes, F4 and F18 fimbriae encoding genes), atypical EPEC (*espA*, *espB*, *tir*, *eae* and variants, absence of *bfpA*), UPEC (P pili encoding genes, *hlyA*, S fimbriae encoding genes, *chuA*, *fepC*, *cnf1*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *iroN*, *usp*), MNEC (*ibeA*, *neuA*, *neuC*), incomplete ExPEC (*kpsM*, *iutA*, *iucD*, *traT*, *malX*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *chuA*, *fepC*, *iss*, *kfiB*).

^b Isolates which do not possess any virulence genes or showing a few scattered virulence-related genes were considered as non-pathogenic.

^c Number of *E. coli* isolates carrying at least one antimicrobial resistance gene.

TABLE 2a. Pathotypes and presence of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolates according to sampling location during spring

| Pathotype ^a | Ankle depth | | 6m depth | | Harbor (24m) | |
|------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
| | Total of isolates | Antimicrobial resistance | Total of isolates | Antimicrobial resistance | Total of isolates | Antimicrobial resistance |
| ExPEC | | | | | | |
| - UPEC | 4 | 0 | 7 | 1 | 11 | 2 |
| - MNEC | 3 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| - Incomplete ExPEC | 9 | 0 | 9 | 3 | 11 | 6 |
| SUBTOTAL : | 16 | 0 | 18 | 5 | 23 | 9 |
| Enteric <i>E. coli</i> | | | | | | |
| - EAEC | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| - ETEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| - Atypical EPEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SUBTOTAL : | 0 | 0 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| Non-pathogenic | 49 | 3 | 38 | 4 | 34 | 7 |
| TOTAL : | 65 | 3 | 59 | 11 | 60 | 18 |

^aPathotype was attributed to *E. coli* samples according to their set of virulence genes or markers: EAEC (*capU*, *shf*, *virK*, aggregative adherence fimbriae encoding genes), ETEC (heat-stable and heat-labile toxin encoding genes, F4 and F18 fimbriae encoding genes), atypical EPEC (*espA*, *espB*, *tir*, *eae* and variants, absence of *bfpA*), UPEC (P pili encoding genes, *hlyA*, S fimbriae encoding genes, *chuA*, *fepC*, *cnf1*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *iroN*, *usp*), MNEC (*ibeA*, *neuA*, *neuC*), incomplete ExPEC (*kpsM*, *iutA*, *iucD*, *traT*, *malX*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *chuA*, *fepC*, *iss*, *kfiB*).

TABLE 2b. Pathotypes and presence of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolates according to sampling location during summer

| Pathotype ^a | Ankle depth | | 6m depth | | Harbor (24m) | |
|------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
| | Total of isolates | Antimicrobial resistance | Total of isolates | Antimicrobial resistance | Total of isolates | Antimicrobial resistance |
| ExPEC | | | | | | |
| - UPEC | 2 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| - MNEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| - Incomplete ExPEC | 11 | 0 | 3 | 1 | 4 | 1 |
| SUBTOTAL : | 13 | 0 | 4 | 2 | 7 | 1 |
| Enteric <i>E. coli</i> | | | | | | |
| - EAEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| - ETEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| - Atypical EPEC | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| SUBTOTAL : | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Non-pathogenic | 32 | 1 | 36 | 2 | 31 | 5 |
| TOTAL : | 45 | 1 | 40 | 4 | 39 | 6 |

^aPathotype was attributed to *E. coli* samples according to their set of virulence genes or markers: EAEC (*capU*, *shf*, *virK*, aggregative adherence fimbriae encoding genes), ETEC (heat-stable and heat-labile toxin encoding genes, F4 and F18 fimbriae encoding genes), atypical EPEC (*espA*, *espB*, *tir*, *eae* and variants, absence of *bfpA*), UPEC (P pili encoding genes, *hlyA*, S fimbriae encoding genes, *chuA*, *fepC*, *cnf1*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *iroN*, *usp*), MNEC (*ibeA*, *neuA*, *neuC*), incomplete ExPEC (*kpsM*, *iutA*, *iucD*, *traT*, *malX*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *chuA*, *fepC*, *iss*, *kfiB*).

TABLE 3. Distribution of antimicrobial resistance genes in *E. coli* according to season and location

| Season | Number of <i>E. coli</i> carrying at least one antimicrobial resistance gene (%) ^a | | | |
|---------|---|----------|--------------|----------|
| | Ankle depth | 6m depth | Harbor (24m) | TOTAL |
| Spring | 3 (7) | 11 (26) | 18 (42) | 32 (74) |
| Summer | 1 (2) | 4 (9) | 6 (14) | 11 (26) |
| TOTAL : | 4 (9) | 15 (35) | 24 (56) | 43 (100) |

^a The percentage is of total of *E. coli* carrying at least one antimicrobial resistance gene.

TABLE 4. Characterization of antimicrobial resistance genes present in *E. coli* isolates

| Antimicrobial agent | Antimicrobial resistance gene ^a | Number of isolates carrying the corresponding resistance gene (%) ^b |
|-----------------------------|--|--|
| Ampicillin | <i>bla</i> _{TEM} | 15 (4.9) |
| | <i>bla</i> _{OXA-1} | 2 (0.6) |
| Tetracycline | <i>tet</i> (A) | 16 (5.2) |
| | <i>tet</i> (B) | 8 (2.6) |
| | <i>tet</i> (C) | 5 (1.6) |
| | <i>tet</i> (D) | 1 (0.3) |
| Streptomycin, Spectinomycin | <i>ant</i> (3'')-Ia | 15 (4.9) |
| Gentamicin | <i>aac</i> (3)-IIa | 1 (0.3) |
| Kanamycin, Neomycin | <i>aph</i> (3')-Ia | 3 (1.0) |
| Chloramphenicol | <i>cat</i> I | 4 (1.3) |
| Trimethoprim | <i>dhfr</i> I | 5 (1.6) |
| | <i>dhfr</i> VII | 2 (0.6) |
| Sulfonamide | <i>sul</i> I | 6 (1.9) |
| | <i>sul</i> II | 13 (4.2) |

^a After hybridization, all isolates produced negative results with probes specific for *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-7}, *bla*_{PSE-4}, *bla*_{CTX-M}, *tet*(E), *tet*(Y), *ant*(2'')-Ia, *aac*(3)-IV, *aph*(3')-IIa, *cat*II, *cat*III, *flo*R, *dhfr*V, *dhfr*IX, *dhfr*XIII and *dhfr*XV.

^b The percentage = number of resistant gene isolates/ total *E. coli* isolates (308) x 100.

Article II :

**Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in
Escherichia coli from different aquatic ecosystems within the St. Clair
River and Detroit River areas**

(Soumis à Applied and Environmental Microbiology en Juin 2006)

Contribution à l'article II

Pour cet article, j'ai effectué la majeure partie du travail expérimental (marquage, hybridation, analyse et synthèse des résultats) et j'ai grandement participé à la rédaction de l'article lui-même.

Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas

Katia Hamelin^{1,2}, Guillaume Bruant³, Abdel El-Shaarawi⁴, Stephen Hill⁴, Thomas A. Edge⁴, John Fairbrother³, Josée Harel³, Christine Maynard¹, Luke Masson¹ and Roland Brousseau*^{1,2}

¹Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montreal, Quebec, CANADA H4P 2R2

²Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, 2900 boul. Édouard Montpetit, Montréal, Québec, CANADA H3T 1J4

³Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, CANADA J2S 7C6

⁴National Water Research Institute, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, Burlington, Ontario, CANADA L7R 4A6

* Corresponding author. Mailing address : Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montreal, Quebec, CANADA H4P 2R2. Phone: (514) 496-6152. Fax: (514) 496-6213. E-mail: [REDACTED]
[REDACTED]

Running title : Extraintestinal pathogenic *E. coli* in surface waters

ABSTRACT

Although the number of *E. coli* in surface waters can vary greatly between locations, there is relatively little known of the occurrence of *E. coli* pathotypes in surface waters used as sources for drinking or recreation. DNA microarray technology is a suitable tool for this type of study due to its ability to detect a high number of virulence and antimicrobial resistance genes simultaneously. Pathotype, phylogenetic group, and antimicrobial resistance gene profiles were determined for 309 *E. coli* isolates from surface water samples collected from diverse aquatic ecosystems at six different sites in the St. Clair River and Detroit River areas. A higher frequency of *E. coli* possessing virulence and antimicrobial resistance genes was observed in an urban site located downstream of wastewater effluent outfalls than in the other examined sites. Most *E. coli* pathotypes were extraintestinal (ExPEC) and belonged to phylogenetic groups B2 and D. The ExPEC pathotypes were found to occur across all aquatic ecosystems investigated including riverine, estuarine, and offshore lake locations. The results of this environmental study using a DNA microarray highlight the widespread occurrence of *E. coli* pathotypes in aquatic ecosystems, and the potential public health threat of *E. coli* pathotypes originating municipal wastewater sources.

INTRODUCTION

Escherichia coli is an important cause of disease in animals and humans worldwide. Strains of *E. coli* can be classified as i) commensal, ii) intestinal pathogenic (enteric/diarrheagenic), or iii) extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (31). *E. coli* pathotypes responsible for intestinal infections include: enteropathogenic (EPEC), enterohemorrhagic (EHEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroaggregative (EAEC), enteroinvasive (EIEC), diffusely adherent (DAEC), necrotoxic (NTEC) and cell-detaching (CDEC) *E. coli* (25). Although pathogenic *E. coli* have been more commonly recognized as intestinal pathogens, extraintestinal *E. coli* infections are also a major source of morbidity, mortality, and increased health costs (30).

ExPEC is the most common cause of urinary tract infections and one of the leading causes of neonatal meningitis and neonatal sepsis in humans, which can lead to serious complications and death (8). Other types of extraintestinal infections include osteomyelitis, pulmonary, intra-abdominal, soft tissue, and intravascular device-associated infections (31). Many specific virulence factors, such as diverse adhesins, toxins, polysaccharide coatings (including capsules and lipopolysaccharides), siderophores, serum resistance determinants, and invasins, are necessary to overcome host defenses and cause extraintestinal disease (14, 34). In certain cases, pathogenicity has been correlated with the presence of genes encoding virulence factors organized on large blocks (plasmids, phages and pathogenicity-associated islands (PAIs)), which allow horizontal dissemination between distinct *E. coli* strains (12, 23, 28).

Although pathogenic *E. coli* are known to be associated with food-borne diseases, relatively few studies have been performed to determine their distribution in environmental surface waters (6, 13, 19, 20, 24, 27). In these studies, ExPEC have been particularly neglected, as enteric pathotypes are generally targeted. In two water-related studies where ExPEC detection was included (13, 24), almost all the pathogenic *E. coli* were characterized as ExPEC. This unexpectedly high percentage of ExPEC underscores the need for additional studies on their environmental prevalence.

ExPEC have been found to share a characteristic distribution within the widely used *E. coli* phylogenetic classification, A, B1, B2, and D, proposed by Clermont *et al.* (7). Most commensal *E. coli* derive from phylogenetic groups A or B1. Obligatory

pathogens responsible for acute and severe diarrhea (EHEC, ETEC and EIEC) also group within the A and B1 groups whereas the pathotypes linked to chronic and mild diarrhea (EPEC, EAEC, DAEC) are distributed across all the four phylogenetic groups (11, 16, 17). In contrast, ExPEC derive predominantly from *E. coli* phylogenetic group B2 and, to a lesser extent, group D (16, 17).

Microarray technology offers the most rapid and practical tool to detect the presence or absence of a large set of virulence genes simultaneously within a given *E. coli* isolate. The oligonucleotide microarray used in the present study carries 348 probes representing 189 virulence and virulence-related genes from all known *E. coli* pathotypes and 30 antimicrobial resistance genes (4), giving a comprehensive picture of the virulence and antimicrobial resistance gene profile of any given isolate. Published data demonstrate that, regardless of phylogenetic group, the virulence factor profile of an *E. coli* isolate predicts its *in vivo* pathogenicity in animal models of extraintestinal infection, providing evidence that virulence factor testing can be used to infer actual virulence potential (15). In addition, it has been suggested that the number of ExPEC virulence genes in an *E. coli* isolate is proportional to its pathogenic potential (29).

In the present study, *E. coli* were isolated from surface water samples at six locations in the St. Clair River and Detroit River area representing diverse fecal pollution influences ranging from an urban municipal wastewater impacted site to a relatively unpolluted site several kilometers offshore in Lake St. Clair. The four primary sampling locations also represented different aquatic ecosystems ranging from nearshore and offshore lake environments, to an urban riverine environment and a rural estuarine environment. Results showed that the occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *E. coli* varied significantly between sampling locations and that the *E. coli* pathotypes encountered were mostly ExPEC.

MATERIALS AND METHODS

Study area. Water samples were collected from four primary sampling locations, chosen to represent different aquatic ecosystems and fecal pollution influences: Site 1, nearshore Lake Huron water at the mouth of the St. Clair River collected several hundred meters from the shoreline; Site 2, offshore Lake St. Clair water collected several kilometers from the shoreline; Site 3, estuarine water from the mouth of the Thames River collected downstream from a rural agricultural landscape; and Site 4, riverine water from the Detroit River just downstream from the City of Detroit and the mouth of the Rouge River. Sites 1 and 2 were selected to represent relatively unpolluted sites without significant fecal pollution sources known to be nearby. Site 3 was anticipated to be influenced by diverse upstream sources of fecal pollution from agricultural activities, small towns and wildlife, although there were marshlands in the immediate area near the sampling location. Site 4 was selected to represent a location likely impacted by urban municipal wastewater sources from combined sewer and sanitary sewer outfalls and the discharge of a sewage treatment plant. The two secondary sampling locations were: Site 5, the middle of the Detroit River offshore from downtown Detroit; and Site 6, the Canadian side of the Detroit River just downstream of Fighting Island where a large colony of sea gulls resides. The secondary sampling locations were selected to explore the possibility of unique virulence and antimicrobial resistance patterns for sites representing surface water run-off from a densely populated urban environment and bird impacted waters respectively. Characteristics of the different sampling locations are shown in Table 1 and their geographical positions shown in Figure 1.

Water sampling and *E. coli* isolation. Water samples were collected in sterile 250 mL or 1 litre polypropylene bottles on July 26-27, 2005. The samples were collected from the research vessel Limnos using an ISOMET sampler (22) that permitted opening of water bottles away from the hull and at a depth of about 0.5 m below the surface of the water. Other water samples, including those from the Lake St. Clair offshore site, were collected by a smaller boat launched from the Limnos. Ten to twelve water samples were collected at each site and processed immediately on board the vessel. Volumes of

between 100-300 mL of water were filtered through 0.45 μ m membrane filters (up to 12 L were processed for some sites). The filters were incubated overnight at 44.5°C on differential coliform agar supplemented with lactose, the chromogenic substrate 5-bromo-6-chloro-3-indolyl glucuronide (BCIG) and cefsulodin (Oxoid Inc.). Up to ten positive colonies from each water sample were randomly picked with a sterile toothpick and streaked onto MacConkey agar (Difco Inc.) for overnight growth at 37°C. Putative *E. coli* isolates were tested for glucuronidase activity by growth and fluorescence in EC-MUG (Difco Inc.), and for indole production by growth in 1% (w/v) tryptone (Difco Inc.) and reaction with Kovac's reagent (Oxoid Inc.). Isolates positive for both tests were stored at -80°C in tryptic soy broth and 15% (v/v) glycerol. *E. coli* ATCC 29194 and *Klebsiella* ATCC 33495 were used as a positive and negative controls respectively, during confirmatory tests.

DNA extraction. *E. coli* isolates were grown overnight in 5 mL of tryptic soy broth at 37°C. One mL of this cell suspension for each isolate was transferred to 1.5 mL centrifuge tubes and spun at 15,500 X g for 2 min. The supernatants were removed and the cell pellets resuspended in 200 μ L of sterile water by vortexing. The suspensions were boiled for 10 min, centrifuged as before and 150 μ L of each supernatant containing DNA was removed for testing.

***E. coli* DNA labeling.** Bacterial DNA was labeled using the Bioprime® DNA Labeling System (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario). In order to remove any contaminating RNA, 2 μ L of RNase A (10 mg/mL), (USB, Cleveland, OH, USA) was added to the genomic DNA sample for 2 min at 24°C, followed by centrifugation (15,500 x g, 2 min, 24°C). Four μ L of the supernatant were added to a final volume of 50 μ L containing 20 μ L of a Random Primers Solution, 1 μ L of high concentration DNA polymerase (Klenow fragment, 40 U/ μ L), 5 μ L of a dNTP mix (1.2 mM dATP, 1.2 mM dGTP, 1.2 mM dTTP and 0.6 mM dCTP in 10 mM Tris pH 8.0 and 1 mM EDTA) and 2 μ L of 1 mM Cy5-dCTP. Labeling reactions were performed in the dark at 37°C for 3.5 hours and stopped by addition of 5 μ L Na₂EDTA 0.5M, pH 8.0. After adding 2.5 μ L of 3M sodium acetate pH 5.2, the labeled samples were then purified with

a PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The amount of incorporated fluorescent Cy5 dye was then quantified by scanning the DNA sample from 200 to 700 nm and subsequently inputting the data into the internet-based Percent Incorporation Calculator found at http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/percent_inc.html. The incorporation of Cy5 in each sample were between 3 and 6 %.

DNA microarray The microarray used in this study is based on earlier published work (2) with the addition of recently identified virulence-related genes in *E. coli* and the antimicrobial resistance genes most commonly encountered in Gram-negative bacteria (21). The current version carries 348 oligonucleotides (70-mers) targeting 189 virulence or virulence-related genes representing all known *E. coli* pathotypes and 30 antimicrobial resistance genes (4). The microarray also carries four positive control DNAs for *E. coli* derived from the tryptophanase (*tnaA*), beta-glucuronidase (*uidA*), lactose permease (*lacY*) and the beta-galactosidase (*lacZ*) gene sequences. Negative controls consist of oligonucleotides derived from the green fluorescent protein gene sequence of *Aequoria victoria* and the chlorophyll synthase gene from *Arabidopsis thaliana*. Microarray construction, validation and oligonucleotide probe sequence information have been published elsewhere (4).

Hybridization of labeled DNA. Microarrays were prehybridized at 50°C for 1 hour, under a 22 × 60 mm Hybri-slip (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) in a slide Hybridization Chamber (Corning Canada, Whitby, Ontario), with 30 µL of prewarmed DIG Easy Hyb™ buffer (Roche Diagnostics, Laval, Quebec) containing 5% (v/v) BSA (1 mg/mL) (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA). After prehybridization, the Hybri-slip was removed by dipping the slide in 0.1X SSC (15 mM NaCl and 1.5 mM trisodium citrate, pH 7.0), and the slide was dried by centrifugation at 800 x g for 5 min. Before hybridization, 1 µg of labeled DNA was resuspended in 6 µL of prewarmed DIG Easy Hyb™ buffer (Roche Diagnostics) and denatured by heating 5 min at 95°C. Microarrays were then hybridized overnight at 50°C, under 11 × 11 mm Hybri-slips in a slide hybridization chamber. After hybridization, the Hybri-slips were removed by

dipping the slide in 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate, pH 7.2) and four stringency washes (three in 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS and one in 0.1X SSC) were performed at 37°C for 5 min under agitation. The slide was then air dried and scanned at a resolution of 10 μ m at 85% laser power, with a ScanArray® Lite fluorescent microarray analysis system (Perkin-Elmer, Mississauga, Ontario). Acquisition of fluorescent spots and quantification of fluorescent spot intensities were performed using the ScanArray Express® software version 2.1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). All data were normalized by subtracting local background from the recorded spot intensities from one sub-array. For each sub-array, the median value of each set of triplicate spotted oligonucleotides was compared to the median value of the sub-array from which the triplicate set of spots was derived. Oligonucleotides with a signal-to-noise fluorescence ratio greater than 2.0 were considered as positive.

Pathotype and phylogenetic group classification. Each *E. coli* isolate was assigned to a particular pathotype according to its set of virulence genes or markers: EAEC (*capU*, *shf*, *virK*, aggregative adherence fimbriae encoding genes); atypical EPEC (*espA*, *espB*, *tir*, *eae* and its variants, and absence of *bfpA*); ExPEC subgroup UPEC (P pili encoding genes, *hlyA*, S fimbriae encoding genes, *chuA*, *fepC*, *cnf1*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *iroN*, *usp*); ExPEC subgroup SEPEC (*cdtB-3*, *cdtB-2*, *cdtB-1*, *cdtB-4*, *cnf2*, *F17A*, *f165(1)A*, *iucD*, *gafD*); ExPEC subgroup MNEC (*ibeA*, *neuA*, *neuC*); and other ExPEC (*kpsM*, *iutA*, *iucD*, *traT*, *malX*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *chuA*, *fepC*, *iss*, *kfiB*) (25). *E. coli* isolates were assigned to a phylogenetic group based on the presence of the *chuA*, *tspE4.C2* and *yjaA* genes as described by Clermont (7).

Statistical analysis. Likelihood ratio test (18) was used to assess significance of comparative results under the binomial and multinomial models.

RESULTS

Virulence genes associated with ExPEC are not as definable as for enteric pathotypes, and classification is sometimes arbitrary. For the purposes of this study, we have defined other ExPEC as *E. coli* isolates carrying ExPEC related-genes without being assignable to one of the three defined ExPEC classes, UPEC, MNEC or SEPEC (13). This category includes commensal *E. coli* possessing virulence genes which may have been acquired through genetic exchanges (17) and UPEC that may have lost genes located on PAIs as some PAIs become unstable at temperatures lower than 21°C (23).

Site-specific distribution of *E. coli* isolates according to pathotype. The percentage of *E. coli* pathotypes at the six sampling locations is shown in Table 2a. The percentage of *E. coli* pathotypes was significantly higher at Sites 4 and 5 near Detroit which were anticipated to be more influenced by urban municipal wastewater than other locations. For the four primary locations, there was a greater percentage of *E. coli* pathotypes at Site 4 (48%) than at Sites 1 (27%), 2 (20%) and 3 (27%). These differences are highly significant ($p < 0.003$). The two secondary sites were located close to Site 4 downstream of Detroit City so similar results to those obtained for Site 4 might have been expected. However, whereas Site 5 had almost the same proportion of *E. coli* pathotypes (50%) as Site 4, Site 6 (near Fighting Island) had only 18% of pathogenic *E. coli*.

Most pathotype isolates were classified as ExPEC, which were found to occur across all aquatic ecosystems investigated, including riverine, estuarine and offshore lake locations. A relatively low percentage of enteric pathotypes was found, except for at Site 2 in the middle of Lake St. Clair, where enteric pathotypes were found more frequently than ExPEC (Table 2a). These results are consistent with two other studies that demonstrated a relatively high percentage of ExPEC in surface waters (13, 24). No EHEC were detected in water samples, atypical EPEC and EAEC being the only intestinal pathotypes found in our study. Site 4 (urban) demonstrated a large diversity of ExPEC pathotypes, including UPEC and SEPEC, and was the only one where a MNEC pattern was observed. In comparison, Site 1 in Lake Huron possessed the least diversity of pathotypes. Although Site 5 demonstrated the same overall percentage of *E. coli* pathotypes as Site 4, only the pathotype “other ExPEC” was found in the latter.

It is noteworthy that 25% of all of the *E. coli* isolates carried unusual virulence gene combinations (that do not correspond to a specific pathotype) and/or at least three antimicrobial resistance genes, yet these were not classified as pathotypes by our criteria. The frequency of *E. coli* pathotypes reported in this study can therefore be considered as somewhat conservative.

Phylogenetic group distribution. The percentage of *E. coli* isolates in each phylogenetic group differed according to the location (Table 2b). Sites 1 and 2 showed a similar distribution among the different phylogenetic groups, with most *E. coli* isolates belonging to groups A and B1 and only a few belonging to groups D and B2. In Site 3, only 2% of isolates were classified in group A whereas 65% belonged to group B1. The isolates were almost equally distributed among the four phylogenetic groups in Site 4, which was the only site where a substantial percentage of isolates belonged to group B2. On the other hand, the secondary location Site 5 showed a higher percentage of *E. coli* in group D (80%), whereas Site 6 showed a majority of isolates belonging to group A (64%), although the samples sizes were small.

The distribution of the pathotypes among the phylogenetic groups was consistent with other published data (Table 3) (16). Indeed, *E. coli* that were not pathotypes primarily belonged to groups A and B1 whereas ExPEC are found in group B2 and, to a lesser extent, group D. On the other hand, atypical EPEC and EAEC were distributed among the various groups (11, 16, 17). It is noteworthy that only one *E. coli* isolate belonging to group B2 was not classified as a pathotype.

Site-specific distribution of *E. coli* isolates possessing antimicrobial resistance genes. Based on the frequency of antimicrobial resistance genes, the six sites were divided into three sets ($p < .001$). The highest frequency of antimicrobial resistance genes occurred at Site 4, the second highest at Site 1, whereas the other sites formed a homogeneous set (Table 4). Downstream from Detroit City (Site 4), 27% of *E. coli* isolates were found to carry at least one antimicrobial resistance gene whereas there were 18 % such isolates in Site 1. Very low percentages of *E. coli* carrying antimicrobial resistance genes were found in Sites 2 and 3, where only 0% and 3% were found

respectively. The two secondary locations showed 0% (Site 5) and 9% (Site 6) of *E. coli* isolates carrying antimicrobial resistance genes.

The antimicrobial resistance genes most frequently detected were *tet(A)* and *tet(B)* (44% and 28% respectively among *E. coli* carrying resistance genes), *bla_{TEM}* (53%), and *sulIII* (39%) which code for resistance to tetracycline, ampicillin, and sulfonamide respectively (Table 5).

Site-specific distribution of *E. coli* isolates possessing a *tsh* gene. The *tsh* gene was tested across sampling locations as a possible marker for *E. coli* originating from an avian source (Table 6) (9, 35). The greatest frequency of *E. coli* isolates carrying the *tsh* gene was found at Site 3 in the estuary at the mouth of the Thames River (17%), followed by Site 1 in nearshore Lake Huron water (11%) and Site 2 in offshore Lake St. Clair water (9%). No *E. coli* carrying the *tsh* gene were found in the urban Site 4 nor at Site 6. Urban Site 5 showed approximately 30% *tsh* positive isolates, although the sample size at this site was small. Except for Site 2, most *E. coli* isolates carrying *tsh* gene were not pathotypes.

DISCUSSION

This study investigated the occurrence of pathogenic and antimicrobial resistant *E. coli* in water samples from the St. Clair River – Detroit River area. The transboundary waters in this area are an important shared resource for millions of people in Canada and the United States. Microbial water quality is a significant concern for many communities who rely on these source waters for drinking and recreation. A number of binational Areas of Concern currently identify beach closures as important water use impairments, and concern has been raised about pathogen pollution and the spread of antibiotic resistant bacteria in the Great Lakes basin ecosystem (1)

The results showed that ExPEC *E. coli* were found to occur at every aquatic ecosystem location we sampled. Overall, the site most influenced by urban municipal wastewater (Site 4) demonstrated the highest percentage of *E. coli* pathotypes as well as *E. coli* carrying antimicrobial resistance genes. At this site, ExPEC were found that classified as MNEC, UPEC and SEPEC, associated with meningitis, urinary tract infection, and septicemia, respectively, and intestinal *E. coli* pathotypes were also observed. These isolates belonged to both the D and B2 phylogenetic groups, the latter being the predominant group from which ExPEC are derived (16). While this study did not determine the specific source of *E. coli* isolates, it is likely that the isolates from Site 4 were from nearby CSO or sewage treatment plant outfalls, suggesting the importance of municipal wastewater as a potential source for *E. coli* pathotypes. Another interesting finding was the higher percentage of *E. coli* pathotypes carrying antimicrobial resistance genes at Site 4. This may reflect the influence of human antibiotic use, and again, suggests the importance of municipal wastewater as a potential source of antimicrobial resistant *E. coli* pathotypes.

A fairly high percentage of *E. coli* pathotypes (27%) and *E. coli* carrying resistance genes (18%) were found at Site 1 which was anticipated to be relatively unpolluted. Site 1 was several hundred meters out from the shoreline, and away from obvious nearby fecal pollution point sources. While the site had low numbers of *E. coli*, the relatively high frequency of antimicrobial resistance was unexpected. It is possible these *E. coli* in the nearshore waters were able to persist and be transported by alongshore currents from unknown human or agricultural sources.

While the lack of antimicrobial resistance genes was anticipated several kilometers offshore at Site 2 in Lake St. Clair, the relatively high frequency of intestinal *E. coli* pathotypes was unexpected. About 97% of the water entering Lake St. Clair comes from the St. Clair River, with the rest provided by the two watersheds on each side of the lake (33). The presence of the deep shipping channel that divides the lake encourages water to flow right through from the St. Clair River to the Detroit River without being retained. As a result, the lake's water is completely exchanged every five to seven days (33). It is possible the *E. coli* collected at Site 2 were recently deposited from boat or bird sources, or that they were able to persist and be transported relatively quickly offshore from fecal pollution sources such as municipal wastewater outfalls in the St. Clair River.

The Thames River drains extensive agricultural lands in southern Ontario, and it was originally anticipated that Site 3 might reflect a more agriculture-based fecal pollution influence. However, at the time of sample collection, water flow was very slow near the river mouth, and the environment immediately around the sampling location was more one of marshes along the river banks rather than agricultural lands runoff. It is possible that fecal pollution at the site might have originated from more local sources such as birds and other wildlife species along the river banks, which would be consistent with the relatively high frequency of the *tsh* gene and the relatively low frequency of antimicrobial resistance genes found in *E. coli* isolates at this site. The *tsh* gene has been suggested as a possible marker for indicating the presence of fecal pollution from an avian source like waterfowl (13, 26, 35). A number of studies have found *E. coli* from wildlife exhibiting a relatively lower prevalence of antimicrobial resistance as compared to human or agricultural sources (10, 32).

Results showing that *tet(A)*, *tet(B)*, *bla_{TEM}* and *sulII* are the most abundant antimicrobial resistance genes (Table 5) are consistent with those of two other studies demonstrating a similar antimicrobial gene occurrence in the environment (13, 32). In our study, 28% of *E. coli* that carried resistance genes showed the presence of a class 1 integron and also carried two or more antimicrobial resistance genes. Approximately similar numbers of *E. coli* carrying resistance genes were found in all phylogenetic

groups excepted for group D, which included only one isolate carrying a resistance gene (Table 3).

Phylogenetic classification of the *E. coli* isolates from our study showed a good agreement with that of other studies (16, 17). Table 3 clearly shows that there is a link between phylogenetic group and occurrence of virulence genes. Non-pathotype isolates were mostly in groups A and B1 whereas extraintestinal *E. coli* were predominantly in phylogenetic group B2 and, to a lesser extent, group D. The difference between groups D and B2 was clearly shown as group B2 contained only *E. coli* pathotypes (except for one isolate) and group D included both pathotype and non-pathotype *E. coli*. Furthermore, the results were consistent with our use of the classification “other ExPEC” pathotype, as these isolates mostly belonged to groups D and B2. Our results also confirmed certain findings of others, such as the presence of *sfafoc* operon only in the phylogenetic group B2 (data not shown) (3). The high percentage of ExPEC belonging to the B2 phylogenetic group has also been observed in previous studies where these isolates were associated with both human and non-human mammalian extraintestinal infections (5).

The occurrence of isolates not classified as pathotypes, but yet possessing a subset of virulence genes could be explained by the high genome plasticity of *E. coli*. This plasticity exists due to the dynamic genetic exchange of virulence genes through plasmids, pathogenicity islands, and other mobile genetic elements. These genetic factors contribute to the rapid evolution of *E. coli* strains and to the formation of unusual virulence gene combinations that could potentially lead to the evolution of new pathotypes. Further studies are needed to verify whether some of these unusual patterns demonstrate pathogenicity in tissue culture or animal models.

In conclusion, we found ExPEC *E. coli* in diverse aquatic ecosystems and at all six locations that we sampled in the St. Clair River and Detroit River area, using our microarray. There was considerable variation in the frequency of virulence and antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolates from the different sites. However, the occurrence of the highest frequency of *E. coli* pathotypes in surface waters most likely impacted by municipal wastewater sources underscores the importance of managing combined sewer and sanitary sewer overflows and sewage treatment plant effluents. Our

finding that the majority of the *E. coli* pathotypes in aquatic ecosystems were ExPEC is a potential public health concern as *E. coli* of this pathotype are responsible for an estimated 40,000 deaths and expenditure of at least \$2.6 billion annually in the United States alone (30). Therefore, our data clearly indicate a need to further investigate the occurrence of pathogenic *E. coli*, especially ExPEC, in source waters used for drinking, recreation and irrigation in order to better understand the implications for public health.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Charlotte Curtis, Bailey Davis, Alyssa Loughborough, Kinga Smolen, Flora Suen, and the crew of the Limnos for assistance in sample collection. Particular thanks to Bailey Davis for also assisting with DNA extractions. Funding was provided by the Great Lakes 2020 program and the Canadian Water Network.

REFERENCES

1. **Anonymous.** 2004. International Joint Commission of the Great Lakes -Twelfth Biennial Report on Great Lakes Water Quality.
2. **Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother, and J. Harel.** 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2113-2125.
3. **Bingen, E., B. Picard, N. Brahimi, S. Mathy, P. Desjardins, J. Elion, and E. Denamur.** 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J. Infect. Dis.* **177**:642-650.
4. **Bruant, G., C. Maynard, S. Bekal, I. Gaucher, L. Masson, R. Brousseau, and J. Harel.** 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for the detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3780-3784.
5. **Cherifi, A., M. Contrepois, B. Picard, P. Goulet, I. Orskov, F. Orskov, and J. De Rycke.** 1991. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup 06 isolates from human and animal infections. *FEMS Microbiol. Lett.* **64**:225-230.
6. **Chern, E. C., Y. L. Tsai, and B. H. Olson.** 2004. Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:356-362.
7. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4555-4558.
8. **de Louvois, J.** 1994. Acute bacterial meningitis in the newborn. *J. Antimicrob. Chemother.* **34 Suppl A**:61-73.
9. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* **30**:299-316.
10. **Edge, T. A., and S. Hill.** 2005. Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Can. J. Microbiol.* **51**:501-505.

11. **Escobar-Paramo, P., O. Clermont, A. B. Blanc-Potard, H. Bui, C. Le Bouguenec, and E. Denamur.** 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **21**:1085-1094.
12. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:641-679.
13. **Hamelin, K., G. Bruant, A. El-Shaarawi, S. Hill, T. A. Edge, S. Bekal, J. M. Fairbrother, J. Harel, C. Maynard, L. Masson, and R. Brousseau.** 2006. A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* from Great Lakes recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:4200-4206.
14. **Johnson, J. R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:80-128.
15. **Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, A. Gajewski, D. F. Sahm, and J. A. Karlowsky.** 2004. Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000-2001. *J. Infect. Dis.* **190**:1739-1744.
16. **Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, T. T. O'Bryan, and J. N. Maslow.** 2002. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* **185**:1439-1447.
17. **Johnson, J. R., and T. A. Russo.** 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J. Lab. Clin. Med.* **139**:155-162.
18. **Kalbfleisch, J. G.** 1979. *Probability and statistical inference*, vol. 2. Springer-Verlag, NY.
19. **Lauber, C. L., L. Glatzer, and R. L. Sinsabaugh.** 2003. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in recreational waters. *J. Great Lakes Res.* **29**:301-306.
20. **Martins, M. T., I. G. Rivera, D. L. Clark, and B. H. Olson.** 1992. Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal *o*-nitrophenol- β -

- D-galactopyranoside-4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide media. Appl. Environ. Microbiol. **58**:3095-3100.
21. **Maynard, C., S. Bekal, F. Sanschagrín, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière, and J. Harel.** 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. J. Clin. Microbiol. **42**:5444-5452.
 22. **McCrea, R., N. Madsen, R. Reid, G. Lawson, G. Sardinella, and M. L. Archer.** 2004. Whole water sampling techniques for the determination of trace mercury and trace metal concentrations that do not require in-field clean-room facilities, vol. State of the Strait: Monitoring for sound management. A binational conference on the Detroit River ecosystem. Great Lakes Institute for Environmental Research, Occasional Paper No. 4, University of Windsor, Windsor, Ontario.
 23. **Middendorf, B., B. Hochhut, K. Leipold, U. Dobrindt, G. Blum-Oehler, and J. Hacker.** 2004. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. J. Bacteriol. **186**:3086-3096.
 24. **Muhldorfer, I., G. Blum, A. Donohue-Rolfe, H. Heier, T. Olschlager, H. Tschape, U. Wallner, and J. Hacker.** 1996. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from environmental water habitats and from stool samples of healthy volunteers. Res. Microbiol. **147**:625-635.
 25. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. **11**:142-201.
 26. **Ngeleka, M., L. Brereton, G. Brown, and J. M. Fairbrother.** 2002. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. Avian Diseases **46**:143-152.
 27. **Obi, C. L., E. Green, P. O. Bessong, B. Villiers, A. A. Hoosen, E. O. Igumbor, and N. Potgieter.** 2004. Gene encoding virulence markers among *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic stool samples and river sources in rural Venda communities of South Africa. Water SA **30**:37-42.

28. **Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt, and J. Hacker.** 2002. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int. J. Antimicrobial Agents* **19**:517-521.
29. **Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion, and E. Denamur.** 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **67**:546-553.
30. **Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* **5**:449-456.
31. **Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**:1753-1754.
32. **Sayah, R. S., J. B. Kaneene, Y. Johnson, and R. Miller.** 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1394-1404.
33. **SCRCA.** 2004. Lake St. Clair: A canadian perspective. <http://www.scrca.on.ca/St.ClairRegionConservationAuthority>.
34. **Siitonen, A.** 1994. What makes *Escherichia coli* pathogenic? *Ann. Med.* **26**:229-231.
35. **Tivendale, K. A., J. L. Allen, C. A. Ginns, B. S. Crabb, and G. F. Browning.** 2004. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh* with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **72**:6554-6560.

TABLE 1. Description of the sampling locations in different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas

| | Primary locations ^a | | | | Secondary locations ^a | |
|--|--------------------------------|-----------|--------|-----------|----------------------------------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Latitude N. | 43°00'30" | 42°28'42" | 42°19' | 42°16'04" | 42°19'40" | 42°11' |
| Longitude W. | 82°25'30" | 82°42'24" | 82°27' | 83°06'42" | 83°01'21" | 83°07' |
| Depth (m) | ND ^b | 6.2 | ND | 10.4 | ND | ND |
| Temperature ^c (°C) | ND | 22 | ND | 28 | ND | ND |
| <i>E. coli</i> count ^d (CFU/100mL) | 0.8 | 1.1 | 13.5 | 93.4 | 1.2 | 33.2 |
| Number of isolates | 44 | 54 | 100 | 89 | 10 | 11 |

^a Locations of sampling were: 1, near shore Lake Huron water at the mouth of the St. Clair River; 2, lake water several kilometers offshore in Lake St. Clair; 3, estuarine water from the mouth of the Thames River downstream from a landscape expected to contribute diverse agricultural, human, and wildlife fecal pollution; 4, river water from the Detroit River just downstream from the mouth of Rouge River and the city of Detroit; 5) the middle of the Detroit River offshore from downtown Detroit; and 6) the Detroit River just downstream of Fighting Island where a large colony of sea gulls resides.

^b ND = not determined

^c Water temperature at the surface.

^d The *E. coli* counts are the mean from n = 10 or 12 water bottles.

TABLE 2a. Percentage of *E. coli* pathotypes among isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas

| <i>E. coli</i> pathotype | % of <i>E. coli</i> isolates at location ^a : | | | | | |
|---|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Primary | | | | Secondary | |
| | 1 % ^b | 2 % | 3 % | 4 % | 5 % | 6 % |
| ExPEC^c | | | | | | |
| - MNEC | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 |
| - UPEC | 5 | 0 | 4 | 6 | 0 | 0 |
| - SEPEC | 0 | 2 | 7 | 4 | 0 | 0 |
| - Other | 20 | 7 | 14 | 25 | 50 | 18 |
| - Total | 25 | 9 | 25 | 42 | 50 | 18 |
| Intestinal pathotype^c | | | | | | |
| - EAEC | 0 | 7 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| - Atypical EPEC | 2 | 4 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| - Total | 2 | 11 | 2 | 6 | 0 | 0 |
| Non-pathotype | 73 | 80 | 73 | 52 | 50 | 82 |
| TOTAL : | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

^a Sampling locations were defined as in Table 1.

^b The percentage = number of pathotype isolates/ total *E. coli* isolates for one location x 100.

^c Pathotype was attributed to *E. coli* isolates according to their set of virulence genes or markers: EAEC (*capU*, *shf*, *virK*, aggregative adherence fimbriae encoding genes); atypical EPEC (*espA*, *espB*, *tir*, *eae* and variants, absence of *bfpA*); ExPEC subgroup UPEC (P pili encoding genes, *hlyA*, S fimbriae encoding genes, *chuA*, *fepC*, *cnf1*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *iroN*, *usp*); ExPEC subgroup SEPEC (*cdtB-3*, *cdtB-2*, *cdtB-1*, *cdtB-4*, *cnf2*, *F17A*, *fl65(1)A*, *iucD*, *gafD*); ExPEC subgroup MNEC (*ibeA*, *neuA*, *neuC*); and other ExPEC (*kpsM*, *iutA*, *iucD*, *traT*, *malX*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*, *chuA*, *fepC*, *iss*, *kfiB*). Isolates lacking any virulence genes or showing a few scattered virulence-related genes were not considered pathotypes.

TABLE 2b. Frequency of phylogenetic groups among *E. coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas

| <i>E. coli</i> group | | % of <i>E. coli</i> isolates at location ^a : | | | | | |
|-------------------------|---------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Primary | | | | Secondary | |
| | | 1 % ^b | 2 % | 3 % | 4 % | 5 % | 6 % |
| A | Non-pathotype | 32 | 18 | 2 | 26 | 10 | 64 |
| | Pathotype | 4 | 6 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | Total | 36 | 24 | 2 | 28 | 10 | 64 |
| B1 | Non-pathotype | 39 | 49 | 63 | 22 | 0 | 18 |
| | Pathotype | 7 | 4 | 2 | 4 | 0 | 0 |
| | Total | 46 | 53 | 65 | 26 | 0 | 18 |
| D | Non-pathotype | 2 | 12 | 8 | 4 | 30 | 0 |
| | Pathotype | 7 | 4 | 12 | 12 | 50 | 9 |
| | Total | 9 | 16 | 20 | 16 | 80 | 9 |
| B2 | Non-pathotype | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 |
| | Pathotype | 9 | 7 | 13 | 30 | 0 | 9 |
| | Total | 9 | 7 | 13 | 30 | 10 | 9 |

^a Sampling locations were defined as in Table 1.

^b % = number of pathotype isolates/ total *E. coli* isolates for one location x 100.

TABLE 3. Frequency of pathotypes and antimicrobial resistance genes among *E. coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas according to phylogenetic groups (total of isolates)

| <i>E. coli</i> pathotype | % of <i>E. coli</i> isolates in phylogenetic group : | | | |
|--|--|-----------------|---------------|----------------|
| | A % ^a (n=64) | B1 % (n=139) | D % (n=56) | B2 % (n=50) |
| ExPEC^b | | | | |
| - MNEC | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 1.0 |
| - UPEC | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 3.2 |
| - SEPEC | 0.3 | 0.0 | 1.6 | 1.9 |
| - Other | 0.3 | 1.6 | 7.8 | 8.4 |
| - Total | 0.6 | 1.6 | 10.7 | 14.5 |
| Intestinal pathotypes^b | | | | |
| - EAEC | 1.3 | 1.0 | 0.3 | 0.0 |
| - Atypical EPEC | 0.3 | 0.6 | 0.0 | 1.3 |
| - Total | 1.6 | 1.6 | 0.3 | 1.3 |
| Non-pathogtype | 18.5 | 41.8 | 7.1 | 0.3 |
| TOTAL : | 20.7 | 45.0 | 18.1 | 16.2 |
| Positive for antimicrobial resistance genes | 3.2 | 3.9 | 0.3 | 4.2 |

^a The percentage = number of pathogenic isolates/ total *E. coli* isolates (309) x 100.

^b Pathotypes were defined as in Table 2a.

TABLE 4. Frequency of antimicrobial resistance gene positive *E. coli* isolates belonging to different pathotypes in different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas

| <i>E. coli</i> pathotype | % of antimicrobial resistance gene positive <i>E. coli</i> isolates at location ^a : | | | | | |
|--|--|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| | Primary | | | | Secondary | |
| | 1 % ^b | 2 % | 3 % | 4 % | 5 % | 6 % |
| ExPEC^c | | | | | | |
| - MNEC | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| - UPEC | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| - SEPEC | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| - Other | 7 | 0 | 1 | 11 | 0 | 0 |
| - Total | 7 | 0 | 1 | 16 | 0 | 0 |
| Intestinal pathotypes^c | | | | | | |
| - EAEC | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| - Atypical EPEC | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| - Total | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Non-pathotype | 11 | 0 | 2 | 9 | 0 | 9 |
| TOTAL : | 18 | 0 | 3 | 27 | 0 | 9 |

^a Sampling locations were defined as in Table 1.

^b The percentage = number of pathotype isolates/ total *E. coli* isolates for one location x 100.

^c Pathotype were defined as in Table 2a.

TABLE 5. Frequency of antimicrobial resistance genes among 309 *E. coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas

| Antimicrobial agent gene (%) ^b | Antimicrobial resistance gene ^a | Number of isolates carrying the corresponding resistance |
|---|--|--|
| Ampicillin | <i>bla</i> _{TEM} | 19 (6.1) |
| Tetracycline | <i>tet</i> (A) | 16 (5.2) |
| | <i>tet</i> (B) | 10 (3.2) |
| | <i>tet</i> (C) | 1 (0.3) |
| Streptomycin, Spectinomycin | <i>ant</i> (3'')-Ia | 5 (1.6) |
| Gentamicin | <i>aac</i> (3)-IIa | 1 (0.3) |
| Kanamycin, Neomycin | <i>aph</i> (3')-Ia | 2 (0.3) |
| Chloramphenicol | <i>catI</i> | 2 (0.3) |
| Trimethoprim | <i>dhfr</i> V | 1 (0.3) |
| | <i>dhfr</i> VII | 3 (1.0) |
| Sulfonamide | <i>sulI</i> | 5 (1.6) |
| | <i>sulII</i> | 14 (4.5) |

^a After hybridization, all isolates produced negative results with probes specific for *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-7}, *bla*_{PSE-4}, *bla*_{CTX-M}, *tet*(D), *tet*(E), *tet*(Y), *ant*(2'')-Ia, *aac*(3)-IV, *aph*(3')-IIa, *catII*, *catIII*, *floR*, *dhfrI*, *dhfrIX*, *dhfrXIII* and *dhfrXV*.

^b The percentage = number of resistant gene isolates/ total *E. coli* isolates (309) x 100.

TABLE 6. Frequency of *tsh* gene positive *E. coli* isolates belonging to different pathotypic groups in various aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas

| | % of <i>tsh</i> gene positive <i>E. coli</i> isolates at location ^a : | | | | | |
|--|--|--------|--------|--------|-----------|--------|
| | Primary | | | | Secondary | |
| | 1 % ^b | 2 % | 3 % | 4 % | 5 % | 6 % |
| Non-pathotype <i>E. coli</i> with <i>tsh</i> gene | 7 | 2 | 13 | 0 | 30 | 0 |
| Pathotype <i>E. coli</i> with <i>tsh</i> gene | 4 | 7 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Total of <i>E. coli</i> with <i>tsh</i> gene | 11 | 9 | 17 | 0 | 30 | 0 |

^a Sampling locations were defined as in Table 1.

^b The percentage = number of pathotype isolates/ total *E. coli* isolates for one location x 100.

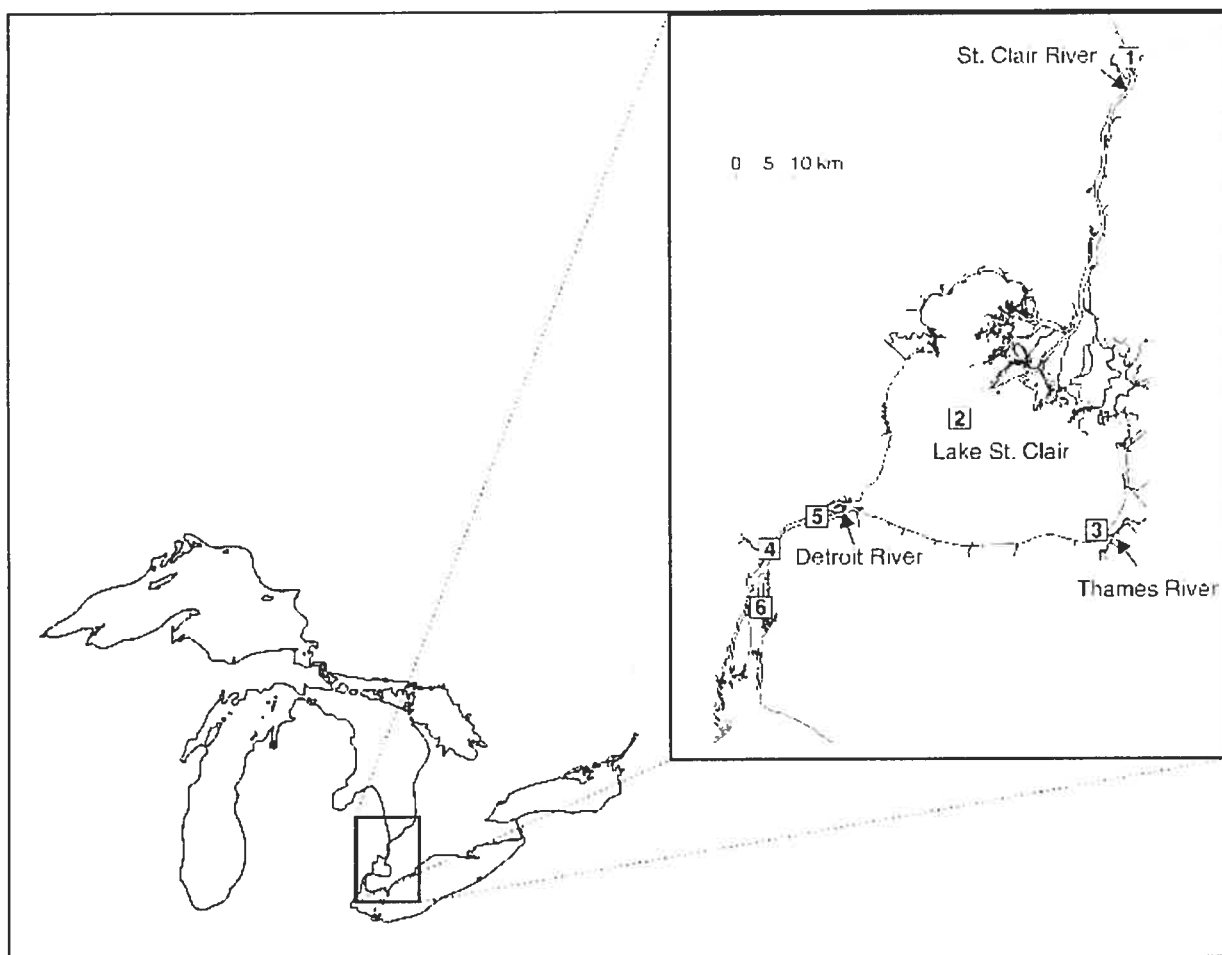


Figure 1. Map of St. Clair River and Detroit River areas showing the location of the sampling sites: 1, near shore Lake Huron water at the mouth of the St. Clair River; 2, lake water several kilometers offshore in Lake St. Clair; 3, estuarine water from the mouth of the Thames River downstream from a landscape expected to contribute diverse agricultural, human, and wildlife fecal pollution; 4, river water from the Detroit River just downstream from the mouth of the Rouge River and the city of Detroit; 5) the middle of the Detroit River offshore from downtown Detroit; and 6) the Detroit River just downstream of Fighting Island where a large colony of sea gulls resides.

SECTION III – Discussion

Discussion

Étude portant sur les isolats *Escherichia coli* dans le port de Hamilton

Les souches pathogènes de la bactérie *Escherichia coli* sont une cause majeure d'infections dans le monde entier. Ces souches peuvent être divisées en deux groupes distincts : les souches intestinales et les souches extra-intestinales (ExPEC). Étant reconnue comme une bactérie associée à la nourriture, très peu d'études ont été menées sur la pathogénicité de *E. coli* dans l'environnement, particulièrement dans l'eau. Pourtant, de nombreuses épidémies dues à *E. coli* sont directement liées à la consommation d'eau contaminée ou à la baignade dans un site contaminé (Agence de Santé Publique du Canada, 2004; O'Connor, 2002; Rice *et al.*, 1999; Swerdlow *et al.*, 1992). *E. coli* est également utilisé comme indicateur de contamination fécale de l'eau (Chern *et al.*, 2004; Lauber *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 1992) sans distinction entre les souches pathogènes et commensales.

La prévalence de *E. coli* pathogènes dans l'eau n'a été abordée, à notre connaissance, que par cinq études. Trois d'entre elles ont trouvé un faible pourcentage de pathogènes (Chern *et al.*, 2004; Lauber *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 1992), tandis que les deux autres ont donné une proportion élevée de pathogènes dans l'eau (Muhldorfer *et al.*, 1996; Obi *et al.*, 2004). Cependant, ces études utilisaient des techniques de criblage (PCR, hybridation d'ADN) ne permettant pas d'obtenir un profil génétique complet et pouvant mener à une sous-estimation du nombre réel de pathogènes.

L'intérêt d'étudier la résistance antimicrobienne dans l'eau est également peu élevé pour la majorité des chercheurs. La présence de *E. coli* portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens n'a donc fait l'objet d'aucune étude directe. Cependant, quelques chercheurs ont émis l'hypothèse que l'eau potable serait un des vecteurs directs de distribution des gènes résistants à certains agents antimicrobiens aux humains sains (Poy, 2003).

Notre étude fait la démonstration d'une nouvelle méthode de criblage, soit la biopuce d'ADN, en établissant le potentiel de pathogénicité et de résistance aux antimicrobiens de 308 souches de *E. coli* provenant d'échantillons d'eau prélevés dans le port de Hamilton (Lac Ontario). En plus de donner la prévalence des *E. coli* pathogènes dans les sites choisis, notre étude donne une information supplémentaire sur la diversité des profils génétiques et la plasticité du génome de cette bactérie.



Figure 2. Carte géographique du port de Hamilton (NWRI, 2005).

1.0 Comparaison avec les études antérieures

1.0.1 Choix du milieu d'échantillonnage

Il est difficile de comparer les différentes études sur la prévalence des *E. coli* pathogènes dans l'eau, car les sites d'échantillonnage varient beaucoup. Sur les trois études ayant donné de faibles proportions de pathogènes, deux d'entre elles ont eu lieu sur un site d'échantillonnage relativement propre soit des eaux de récréation (Lauber *et al.*, 2003) et de l'eau de surface en milieu naturel (Martins *et al.*, 1992). Les isolats de l'autre étude ont été prélevés dans des lagunes de déchets agricoles, milieu où l'on pourrait s'attendre à une plus forte prévalence de pathogènes (Chern *et al.*, 2004). Les deux études ayant obtenu de forts pourcentages de pathogènes ont été menées dans des milieux beaucoup plus contaminés soit une rivière contaminée par une décharge d'eaux usées (Muhldorfer *et al.*, 1996) et une rivière hautement polluée en Afrique (Obi *et al.*, 2004). Bien que nos résultats se rapprochent plus de ces dernières études, notre milieu est considéré comme relativement propre et peut servir de site de baignade. Cela laisse donc sous-entendre que d'autres facteurs peuvent être à l'origine de la divergence entre les résultats des différentes études.

1.0.2 Influence de la méthode de culture

Dans notre étude ainsi que dans la plupart des études antérieures, les méthodes standard de culture pour isoler les *E. coli* démontraient deux lacunes importantes. En effet, les techniques se basaient généralement sur une température d'incubation élevée (44.5°C) et une sélection positive pour l'activité de la β -glucuronidase. Cependant, de nombreuses études ont démontré que les isolats appartenant au pathotype des EHEC (incluant le sérotype O157:H7) ne peuvent pas croître à une température aussi élevée et sont négatifs pour l'activité de la β -glucuronidase (Doyle and Schoeni, 1984; Raghubeer and Matches, 1990; Thompson *et al.*, 1990). Pour cette raison, la fréquence de *E. coli* pathogènes trouvés dans ces études est une estimation minimale. Une seule autre étude a isolé *E. coli* avec une température de 37°C et a obtenu une proportion plus importante

de *E. coli* pathogènes entériques (Obi *et al.*, 2004). Vu l'absence de méthode plus appropriée et pour que nos résultats soient comparables avec les méthodes standard pour le décompte des *E. coli*, nous avons utilisé la méthode standard d'Environnement Canada pour isoler les *E. coli* (croissance à 44.5°C, β -glucuronidase positif) et nous n'avons eu aucun EHEC.

1.0.3 Techniques de criblage

En plus des biais générés par la méthode de culture, la prévalence mesurée des *E. coli* pathogènes est aussi influencée par la technique de criblage utilisée. Il est effectivement difficile de comparer notre étude aux études antérieures parce qu'elles ont toutes détecté les pathogènes en utilisant les techniques habituelles de criblage soit le PCR et l'hybridation ADN-ADN. Ces techniques ne tiennent compte que d'un nombre restreint de gènes de virulence, alors que *E. coli* compte un nombre élevé de facteurs de virulence connus. En choisissant quelques gènes de certains pathotypes, on obtient une image biaisée de la virulence de *E. coli* et l'on ne peut pas chercher tous les pathotypes en même temps. Des choix subjectifs sont donc faits par les chercheurs et cela conduit à une sous-estimation notable du nombre de *E. coli* pathogènes. Notre étude utilise une biopuce d'ADN, ce qui nous permet de détecter la présence de 183 gènes de virulence codant pour tous les pathotypes connus de *E. coli* et d'enlever le biais dû à la sélection subjective d'un faible nombre de gènes. Nous avons ainsi pu obtenir un pourcentage relativement élevé de pathogènes et nous avons constaté la présence de plusieurs combinaisons inusitées de gènes de virulence.

1.1 Prévalence de *E. coli* pathogènes

Étant donné ces combinaisons inhabituelles, nous avons dû utiliser une classe supplémentaire regroupant les ExPEC incomplets. Ces isolats montraient un profil partiel des gènes de virulence des ExPEC, mais possédaient tout de même suffisamment de facteurs de virulence pour que nous ne puissions pas les qualifier de non-pathogènes. Nous avons donc créé une classe appelée « Incomplete ExPEC » dans laquelle nous

avons groupé tous les isolats dont le pathotype (UPEC, MNEC, SEPEC) ne pouvait être identifié, mais qui possédaient plusieurs gènes de virulence liés aux ExPEC. Lorsque l'on consulte la littérature, ces résultats ne sont pas particulièrement surprenants, car plusieurs gènes de virulence des ExPEC sont situés sur des éléments génétiques mobiles comme des plasmides, des bactériophages et des îlots de pathogénicité. Il peut donc y avoir gain de facteurs de virulence chez des souches non-pathogènes et perte de facteurs chez des souches ayant un profil génétique complet et correspondant à un pathotype précis. Il est intéressant de noter que la plupart des souches classées comme ExPEC incomplets auraient été manquées avec les méthodes conventionnelles de criblage. Notre étude a réellement permis de mettre en valeur la variabilité génétique chez les ExPEC.

Nos résultats ont montré une prévalence relativement élevée de *E. coli* pathogènes dans les eaux du port de Hamilton soit 29 % (Table 1, Article I). La majorité d'entre eux étaient des ExPEC contre un très faible pourcentage d'entériques, ce qui diverge de l'idée que *E. coli* est d'abord une bactérie causant des infections intestinales. Certaines études ont effectivement statué que les ExPEC représentent une menace importante pour la santé publique (Russo and Johnson, 2003) et qu'ils sont souvent présents en tant que commensaux dans la flore intestinale humaine (Muhldorfer *et al.*, 1996). On peut même émettre l'hypothèse que les facteurs de virulence caractéristiques des ExPEC leur donnent un avantage sélectif dans la compétition contre d'autres souches intestinales pour la colonisation de l'intestin. Le fait que les ExPEC fassent partie de la flore normale de l'intestin et ne soient pathogènes que dans d'autres sites anatomiques pourrait également intervenir en faveur de la sélection des ExPEC. En effet, les mécanismes de défense de l'hôte sont plus efficaces pour contrer les pathogènes intestinaux rencontrés régulièrement que les souches qui ne représentent pas de danger direct.

Malgré le fait que nos isolats étaient répartis sur trois sites d'échantillonnage (le premier près du bord de la plage de Bayfront Park, le deuxième où l'eau atteint six mètres de profondeur et le troisième au milieu du port de Hamilton où l'eau a 24 mètres de profondeur), les résultats n'ont montré aucune différence dans la prévalence de *E.*

coli pathogènes à ces trois endroits (Tables 2a et 2b, Article I). Comme le port est pollué par quatre stations de traitement des eaux usées et que la plage ne subit que l'influence des oiseaux, nous aurions pensé que les sites peu profonds auraient moins de pathogènes que le port. Cependant, comme la plage est située au fond d'une baie incluant le port de Hamilton, il est possible de poser l'hypothèse que, par le courant venant du reste du lac Ontario, les *E. coli* sont poussés vers le fond de la baie pour amener une uniformisation des pathogènes. L'absence d'accumulation sur la plage au fond de la baie peut être due à la sédimentation élevée de *E. coli*. En effet, plusieurs études ont démontré que, grâce à leur association avec des particules, on peut retrouver une concentration allant jusqu'à 2000 fois plus élevée de coliformes fécaux dans les sédiments que dans la colonne d'eau (An *et al.*, 2002; Buckley *et al.*, 1998; Crabill *et al.*, 1999).

Une différence significative a été remarquée au niveau de la saison d'échantillonnage (Tables 2a et 2b, Article I). En effet, une proportion plus élevée de pathogènes a été trouvée au printemps contre un faible pourcentage en été. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces résultats. D'abord, le port de Hamilton, bien qu'entouré de quelques terres agricoles, est situé dans une zone urbaine (population de 640 000 en 2001) et subit la décharge de quatre usines de traitement des eaux usées. Au printemps, la fonte des neiges entraîne un lessivage des terres ainsi que des villes, ce qui amène une quantité substantielle d'eau polluée à se déverser dans le port de Hamilton. Il a d'ailleurs été démontré que de fortes pluies causent invariablement une augmentation des bactéries dans l'eau, ce qui entraîne la fermeture de bon nombre de plages (Barbe and Francis, 1995; Ministère de l'Environnement de l'Ontario, 2004; O'Connor, 2003). La ville de Hamilton est également en partie desservie par un réseau d'égouts combinés qui rejettent les eaux pluviales et les eaux usées directement dans le port de Hamilton lorsque la quantité d'eau excède la capacité du système (Ville de Hamilton, 2003). De plus, le port et la plage sont fréquentés par des oiseaux migrateurs, comme les oies du Canada, et leur présence est considérable au printemps (lors de la migration) alors qu'ils se font plus rares en été. L'apport important de *E. coli* par ces oiseaux a été démontré lors d'une étude récente (Edge and Hill, 2005). Une dernière hypothèse est l'absence de chloration des effluents finaux par les usines de

traitement des eaux usées jusqu'à la mi-mai. Il est possible que les effluents non-chlorés contribuent à augmenter la fréquence et la diversité des pathotypes de *E. coli* dans les eaux du port de Hamilton au printemps.

1.2 Prévalence de *E. coli* portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens

La résistance des bactéries aux agents antimicrobiens est fort peu étudiée en milieux aquatiques et pourtant, elle pourrait s'avérer une menace pour la santé publique. La présence de bactéries résistantes n'est pas en soi un problème puisqu'elles peuvent très bien être non-pathogènes et n'engendrer aucune maladie. Le danger, c'est que ces gènes résistants soient communiqués à des bactéries pathogènes et qu'il serait ensuite beaucoup plus difficile, voire impossible, de les combattre. En effet, de nombreux gènes de résistance sont situés sur des éléments génétiques transférables comme des plasmides, des transposons et des intégrons (Sayah *et al.*, 2005). Une bactérie inoffensive, mais multirésistante est donc susceptible de transmettre ses propriétés à une autre beaucoup plus dangereuse. Il n'y aurait plus alors plus beaucoup d'antibiotiques disponibles pour traiter l'infection et l'on pourrait avoir du mal à la guérir. L'eau est un média potentiel pour cette transmission.

Dans le cadre de notre étude, près de 14 % des *E. coli* portaient des gènes de résistance aux antimicrobiens (Table 3, Article I). De ce nombre, la moitié était non-pathogène et l'autre appartenait au groupe des ExPEC. Ceci est plutôt étonnant puisque les ExPEC sont reconnus pour être hautement sensibles et même pratiquement éradiqués par une thérapie aux agents antimicrobiens (Russo and Johnson, 2003). Depuis quelques années cependant, on remarque une augmentation de la résistance chez certaines souches d'ExPEC comme les souches causant des infections urinaires et d'autres isolées dans des cliniques de soins à long terme (Russo and Johnson, 2003). Considérant la pathogénicité inhérente aux ExPEC, certaines souches qui ont acquis une capacité de résistance substantielle pourraient étendre leur niche clinique pour devenir une cause significative d'infections nosocomiales.

Nous avons remarqué une différence significative dans la répartition des souches portant des gènes de résistance pour les trois sites de notre étude (Tables 2a et 2b, Article I). En effet, il y avait une proportion beaucoup plus élevée de ces souches dans le milieu du port que dans les deux sites près de la plage. Comme la plage est un site particulièrement prisé par les oiseaux, il est possible de supposer qu'une large part des *E. coli* prélevés proviennent de ces animaux (Edge and Hill, 2005). Or, une étude récente a démontré que très peu de résistance était observée chez les oies du Canada, une espèce grandement présente dans le port de Hamilton (Sayah *et al.*, 2005). Cela nous laisse supposer que les *E. coli* portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens sont principalement d'origine humaine. Étant donné la large utilisation d'agents antimicrobiens lors de l'élevage de bétail, il est dommage de ne pas avoir un site agricole pour comparer nos résultats.

La proportion de *E. coli* portant des gènes de résistance était également plus élevée au printemps qu'en été (Tables 2a et 2b, Article I). Tout comme pour la prévalence de pathogènes, cela peut être dû à la chloration de l'eau par les stations de traitement des eaux usées dès la mi-mai. De plus, ces résultats renforcent l'hypothèse que les *E. coli* portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens sont majoritairement d'origine humaine dans notre étude. Il aurait été intéressant de vérifier l'existence d'une relation entre les gènes de résistance détectés et l'utilisation d'agents antimicrobiens dans la ville de Hamilton. Malheureusement, ces données sont indisponibles pour l'instant.

1.3 Diversité génétique

La plasticité du génome de *E. coli* est en grande partie due au fait que plusieurs gènes de virulence et de résistance aux agents antimicrobiens sont situés sur des éléments génétiques transférables comme des plasmides, des bactériophages et des îlots de pathogénicité. Ces déterminants génétiques contribuent à l'évolution rapide des souches de *E. coli* et peuvent potentiellement créer de nouveaux pathotypes puisqu'ils sont fréquemment sujets à des réarrangements, des excisions ou des transferts

horizontaux. La diversité génétique de *E. coli* est en effet démontrée dans notre étude puisqu'il était peu fréquent d'obtenir exactement le même profil de gènes entre les souches.

Nos résultats nous ont permis de constater quelques combinaisons inattendues de gènes de virulence. Par exemple, le gène *ccdB* (protéine cytotoxique) est généralement reconnu pour être présent chez les EHEC. Dans notre étude cependant, on le retrouve avec des non-pathogènes, des pathogènes entériques et de nombreux ExPEC. Les gènes *etpD* (protéine du système de sécrétion de type II des EHEC) et *fimF41A* (sous-unité des fimbriaes F41 des ETEC) sont presque toujours remarqués ensemble alors que leur pathotype sont très différents. De plus, ils sont exclusivement retrouvés dans des souches non-pathogènes de *E. coli*. Le gène *ECs1282* (qui code pour une protéine filamenteuse similaire à l'hémagglutinine) est supposé se trouver chez les EHEC seulement alors que nous le retrouvons dans plusieurs isolats d'ExPEC ou non-pathogènes. Un autre exemple est le gène *LT-IIaA* (qui code pour la sous-unité A de la toxine thermolabile des ETEC) qui se retrouve souvent seul dans une souche non-pathogène. Certains gènes sont régulièrement associés ensemble comme *leoA* (qui code pour une protéine indispensable pour l'exportation de la toxine thermolabile des ETEC) et *tia* (codant pour une protéine d'invasion des ETEC). Bien que leur pathotype soit le même, leur fonction est fort différente et ils sont retrouvés surtout dans des souches d'ExPEC. Ces exemples sont nombreux et dénotent l'extrême plasticité du génome de *E. coli* surtout chez les ExPEC. La diversité considérable des profils de virulence entre les souches suggère que plusieurs chemins peuvent mener à la virulence extra-intestinale de *E. coli* et que l'évolution des ExPEC, qui implique la transmission horizontale de facteurs de virulence et le remodelage fréquent des îlots de pathogénicité (PAI), est un procédé hautement actif et continu. En effet, les résultats de plusieurs études antérieures démontrent que, malgré le fait que certains gènes de virulence d'ExPEC soient présumés associés à un PAI, les gènes sont hautement mobiles et ce, indépendamment de leur îlots de pathogénicité (Bonacorsi *et al.*, 2000; Hacker *et al.*, 1990; Swenson *et al.*, 1996). Il n'y a aucun doute que cette flexibilité puisse conduire à l'émergence de nouveaux pathotypes.

Étude portant sur les isolats *Escherichia coli* de divers écosystèmes aquatiques

Malgré le fait que *E. coli* soit généralement associé avec des infections dues à la consommation de nourriture contaminée, les infections extra-intestinales par *E. coli* sont une cause majeure de morbidité, de mortalité et d'augmentation des coûts des soins de santé (Russo and Johnson, 2003). Les ExPEC sont la cause la plus commune d'infections urinaires et une des premières causes des méningites et des septicémies néonatales, maladies pouvant mener à de sérieuses séquelles et à la mort (de Louvois, 1994). Les autres infections extra-intestinales typiques incluent les pneumonies, les infections intra-abdominales et les ostéomyélites (Russo and Johnson, 2000). Parmi les six autres études portant sur la prévalence de *E. coli* pathogènes et portant des gènes de résistance dans l'eau, seulement deux ont inclus les ExPEC dans la recherche (Hamelin *et al.*, 2006; Muhldorfer *et al.*, 1996). Cela s'est avéré justifié puisque la majorité des pathogènes étaient des ExPEC dans les deux cas. Jusqu'à maintenant, c'est l'utilisation d'agents antimicrobiens qui a permis de contrôler les infections extra-intestinales causées par les ExPEC (Russo and Johnson, 2003). Cependant, la résistance s'est considérablement accrue chez les ExPEC au cours des dernières années et c'est pourquoi il est important de caractériser ces gènes de résistance chez *E. coli*.

Notre étude tente de démontrer l'impact de zones agricoles, de stations de traitement des eaux usées, de villes à forte densité de population ou de la vie sauvage sur la pathogénicité et la présence de gènes de résistance aux agents antimicrobiens chez *E. coli*. Pour ce faire, nous avons établi, à l'aide d'une biopuce d'ADN, le pouvoir pathogène et la résistance de 309 souches provenant d'échantillons d'eau prélevés dans six écosystèmes différents situés dans la zone des rivières St-Clair et Détroit. Il est à noter que le nombre de *E. coli* testés varie selon le site d'échantillonnage. Cela est dû au fait que, pour certaines locations très peu polluées, le compte total de *E. coli* était trop bas pour permettre la caractérisation d'autant de souches que dans les milieux très contaminés.

2.0 Modification de la biopuce

Plusieurs études antérieures utilisent les groupes phylogénétiques (A, B1, D et B2) pour déterminer la pathogénicité potentielle des souches de *E. coli* (Escobar-Paramo *et al.*, 2004; Johnson and Russo, 2002; Picard *et al.*, 1999). En utilisant le principe de base de la classification en groupe phylogénétique par la présence ou l'absence de trois gènes de virulence (Clermont *et al.*, 2000), nous avons ajouté le gène *tspE4.C2* (un fragment d'ADN codant pour une lipase) sur notre biopuce d'ADN. Comme les gènes *chuA* (un gène requis pour le transport du fer) et *yjaA* (un gène dont la fonction est encore inconnue) étaient déjà présents sur la puce, l'ajout de ce troisième gène nous a permis de classer nos *E. coli* dans les différents groupes phylogénétiques pour estimer la pathogénicité. Par la suite, nous avons pu comparer ces résultats avec le profil obtenu par la caractérisation de l'ensemble des gènes de la puce.

2.1 Prévalence de *E. coli* pathogènes

Notre étude nous a permis de constater d'importantes différences dans la pathogénicité de *E. coli* selon le site d'échantillonnage (Table 2, Article II). Sur la base du compte total de *E. coli* (Table 1, Article II) et de l'environnement, le site le plus en amont (site 1) ainsi que celui du milieu du lac St-Clair (site 2) étaient de loin les moins contaminés par la pollution fécale. Cependant, le site 1, où il y a principalement des forêts et un peu de terres agricoles, a une proportion relativement élevée de *E. coli* pathogènes (27%). Ces résultats divergent de ceux obtenus dans le port de Hamilton et près de la ville de Détroit, où la présence de gènes de virulence et/ou d'antibiorésistance dans *E. coli* est liée à la pollution d'origine humaine. La contamination de l'eau par ces *E. coli* pathogènes et/ou antibiorésistants au site 1 est possiblement liée à l'érosion du littoral, qui est considérée comme modérée à cet endroit (USEPA, 2006). En effet, le site d'échantillonnage est situé près du rivage et l'érosion peut affecter négativement plusieurs composantes d'un écosystème donné ainsi qu'augmenter l'apport en contaminants transportés par des particules de matière suspendue provenant de sites

distants situés en amont (Environnement Canada, 2005). Des études ultérieures seront nécessaires pour clarifier l'origine de ces *E. coli* dans cette zone.

Le site 2, dans le milieu du lac St-Clair, était également présumé relativement propre. En effet, le compte total de *E. coli* était très bas et, étant donné que le lieu d'échantillonnage était situé à plusieurs kilomètres du rivage, on peut penser qu'il n'y a que peu d'impacts par la pollution venant de la côte. De plus, le courant créé par la voie maritime qui divise le lac St-Clair entraîne la formation d'une barrière qui empêche le mélange entre les deux côtés du lac (Figure 3).

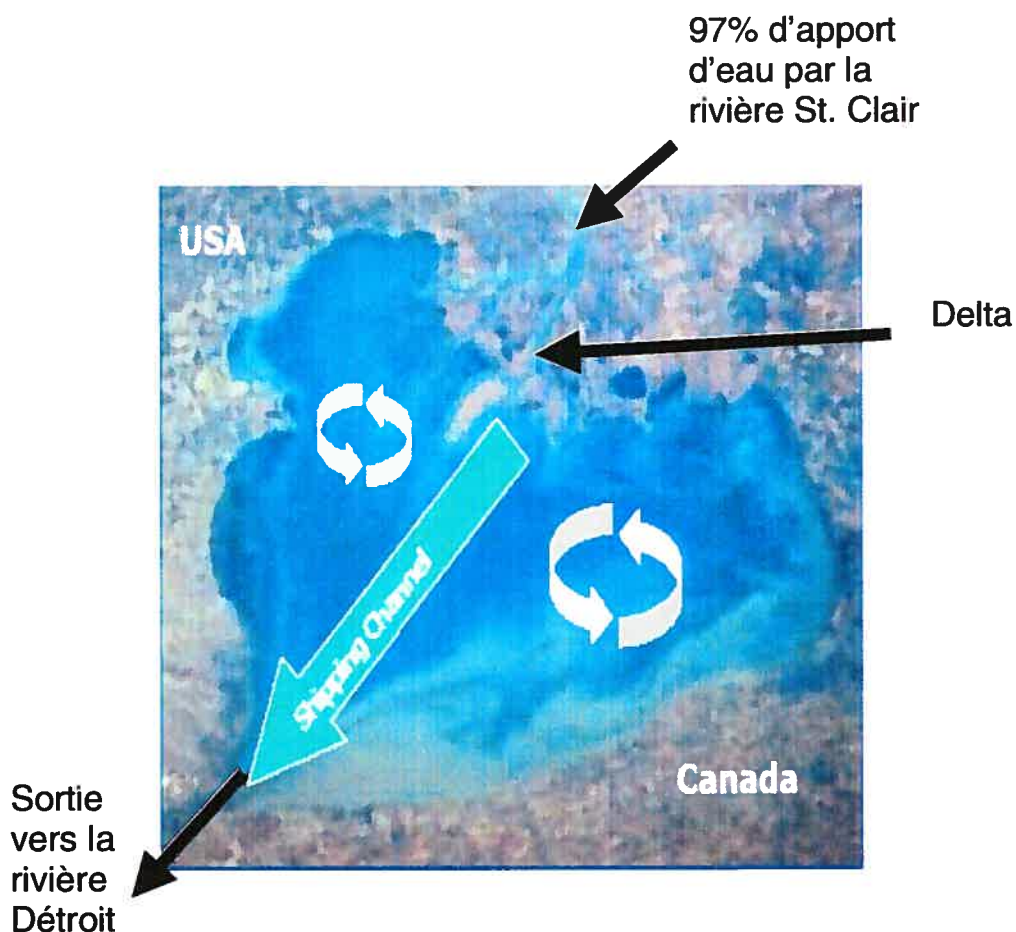


Figure 3. Circulation du courant dans le lac St-Clair en fonction de l'impact de la voie maritime (« shipping channel ») (SCRCA, 2004).

Cependant, les résultats ont montré une proportion de 20% de pathogènes. Ici également, des études ultérieures seront nécessaires pour déterminer si ce pourcentage substantiel de *E. coli* pathogènes provient de l'importante faune indigène vivant dans le delta juste en amont du site d'échantillonnage (SCRCA, 2004) ou plutôt de l'imposant passage de bateaux commerciaux dans le milieu du lac. L'absence complète de gènes de résistance aux antibiotiques tend à indiquer que ces pathogènes proviendraient de la faune indigène.

Le site 3, situé sur les bords du lac St-Clair à la sortie de la rivière Thames, avait un décompte total plus élevé de *E. coli*, ce qui nous permettait de conclure à une pollution fécale modérée à cet endroit. De ce fait, les résultats indiquent une proportion de 27% de *E. coli* pathogènes tout comme dans le site 1. Par la présence du courant dans le lac, la pollution provenant du côté canadien du lac a tendance à rester du même côté sans qu'il n'y ait un brassage des eaux. La rivière Thames draine un nombre considérable de terres agricoles sur son passage vers le lac, cependant, le site 3 ne peut pas être réellement considéré comme pollué par l'agriculture dû au courant extrêmement lent. Ce site est donc un site de pollution mixte soit, venant des oiseaux, de la vie sauvage, des terres agricoles et de la densité peu élevée de population. Le faible pourcentage d'*E. coli* portant des gènes de résistance aux antibiotiques indique un faible impact de la pollution humaine ou agricole. Au cours des dernières années, certains problèmes de contamination bactérienne sur le rivage ont forcé la fermeture de plusieurs plages et suscité une certaine inquiétude face à la santé publique.

Le site 4, situé juste en aval d'un effluent d'une station de traitement des eaux usées dans une région très urbanisée, a donné le plus grand compte total de *E. coli*, ce qui laissait présager une proportion élevée de *E. coli* pathogènes. Ce fut effectivement le cas avec une prévalence de pathogènes atteignant presque 50%. Avec une densité de population estimée à 973 000 personnes pour les villes de Détroit et Windsor combinées ainsi qu'un important trafic maritime, ce site est sans équivoque associé à une pollution presque qu'exclusivement urbaine.

Le site secondaire 5 est situé près de Détroit, mais en amont de l'effluent de la station de traitement des eaux usées qui touche le site 4, ce qui permet de voir son impact direct sur la pathogénicité de *E. coli*. La prévalence de *E. coli* pathogènes étant pratiquement la même (50%) entre les deux sites, il est possible de supposer que les pathogènes s'y retrouvent par le lessivage des rues, la présence d'égouts combinés, ainsi que le transport maritime plutôt que par la station traitement des eaux usées.

Le site secondaire 6, par contre, est situé en aval du site 4 et est tout près d'une île où une importante colonie d'oiseaux a élu domicile (Fighting Island). Cependant, comme lors de l'échantillonnage, aucune présence significative d'oiseaux n'a été remarquée, nous ne pouvons pas conclure que ce site représente un lieu de pollution principalement aviaire. Comme le site 6 est en aval du site 4, nous pouvions nous attendre à une proportion élevée de pathogènes dans l'eau or, ce ne fut pas le cas. Bien que le compte total de *E. coli* ait été relativement élevé, seulement 18% de pathogènes ont été trouvés, ce qui en fait la plus faible prévalence parmi les six sites d'échantillonnage. En regardant l'hydrologie de plus près, nous avons constaté que la présence de l'île divisait le courant et que l'eau venant du côté canadien ne se mélangeait que peu à celle du côté américain. Étant donné que la ville de Détroit a une population estimée à 950 000 contre 23 000 pour la ville de Windsor du côté canadien, on peut facilement comprendre que l'impact de la zone urbaine ne soit pas le même dans les deux cas.

2.2 Prévalence de *E. coli* portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens

Notre étude nous a également permis de faire certaines corrélations entre la proportion de *E. coli* portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens et la source de pollution (Table 3, Article II). Malgré le fait que le site 1 semblait relativement peu pollué par une contamination fécale, les *E. coli* pathogènes se sont avérés nombreux et il en est de même pour les *E. coli* portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens. En effet, le site 1 est le deuxième plus important site en ce qui concerne la proportion de *E. coli* porteurs de gènes de résistance avec 18%. Il est

possible que ces *E. coli* soient amenés jusqu'à l'eau par l'érosion modérée du rivage. Tel que mentionné précédemment, des travaux supplémentaires seront nécessaires pour élucider l'origine de ces *E. coli* pathogènes et/ou antibiorésistants.

En ce qui concerne le site 2, aucun *E. coli* porteur de gène de résistance n'a été retrouvé et seulement 3% ont été comptés pour le site 3. Surprenantes par leurs très faibles pourcentages malgré la présence d'agriculture et de commerce maritime considérable, ces proportions peuvent cependant s'expliquer par la présence importante de vie sauvage près de ces deux sites. En effet, une étude antérieure a démontré une prévalence significativement plus basse d'*E. coli* résistants aux agents antimicrobiens chez les animaux et les oiseaux sauvages (Sayah *et al.*, 2005).

Pour le site 4 situé en zone urbaine, la proportion de *E. coli* portant des gènes de résistance s'est élevée à 27%, ce qui est considérable. Le site 4 est également la seule location où il y avait plus de *E. coli* pathogènes que non-pathogènes qui portaient des gènes de résistance. Le fait que le site secondaire 5, qui avait presque la même proportion de pathogènes que le site 4, n'ait aucun *E. coli* portant des gènes de résistance peut refléter l'impact de l'effluent de la station de traitement des eaux usées située près du site 4 sur la résistance aux agents antimicrobiens et amène la conclusion que les *E. coli* résistants sont majoritairement d'origine humaine. Le site 6 a quant à lui un pourcentage de *E. coli* portant des gènes de résistance de 9%, ce qui corrobore le fait que le courant et la présence de l'île au point d'échantillonnage font varier considérablement le type de *E. coli* retrouvés au site 4 et au site 6.

2.3 Pathotypes entériques

Dans notre étude, seulement deux pathotypes entériques ont été retrouvés : les EPEC atypiques et les EAEC. Ces résultats sont corroborés par une étude antérieure sur les causes de la gastroentérite (Robins-Browne *et al.*, 2004). En effet, cette recherche menée à Melbourne, en Australie, a identifié les EPEC atypiques et les EAEC comme pathogènes les plus fréquemment décelés parmi plusieurs agents bactériens, viraux et

parasitaires chez les gens atteints de gastroentérite. Bien que les EPEC atypiques aient longtemps été considérés comme responsables de moins d'infections entériques que les EPEC (Trabulsi *et al.*, 2002), cette tendance s'est révélée inversée dans de récentes études, où les EPEC atypiques ont dépassé en nombre les EPEC typiques comme cause de gastroentérites et ce dans plusieurs pays (Galane and Le Roux, 2001; Knutton *et al.*, 2001; Paciorek, 2002). Les EAEC ont également été retrouvés chez plusieurs enfants atteints de diarrhée (Abe *et al.*, 2001; Knutton *et al.*, 1992). Il n'est donc pas surprenant de retrouver ces pathotypes dans notre étude.

2.4 *E. coli* portant le gène *tsh* (indicateur aviaire)

En ce qui concerne les *E. coli* portant l'indicateur aviaire *tsh*, des pourcentages de 9%, 11% et 17% ont été retrouvés aux sites 2, 1 et 3 respectivement (Table 5, Article II). Ces résultats sont en accord avec la présence de vie sauvage importante sur ces trois sites. Il est cependant intéressant de noter que le *E. coli* portant *tsh* sont majoritairement non-pathogènes sauf au site 2 pour une raison inexplicée. Le site 4 n'a révélé aucun *E. coli* portant *tsh*, ce qui tend à démontrer que ce site est principalement touché par la pollution urbaine. Le site 5 juste en amont a quant à lui une proportion de 30% de *E. coli* portant *tsh* et l'on peut supposer la présence d'une colonie d'oiseaux à cet endroit. Le site 6, où une large colonie d'oiseaux a élu domicile, n'a montré aucun *E. coli* portant *tsh*. Ce résultat peut s'expliquer par l'absence d'oiseaux lors de la journée de prélèvement. On peut donc émettre l'hypothèse que c'est la présence ponctuelle d'un banc d'oiseaux qui fait augmenter la présence du gène *tsh* chez *E. coli*.

2.5 Classification en groupes phylogénétiques

La répartition dans les quatre groupes phylogénétiques est particulière dans certains sites. Les sites 1 et 2 ont une distribution semblable soit que la majorité des *E. coli* fassent partie des groupes A et B1. Le site 3, par contre, a une très faible proportion de seulement 2% de *E. coli* dans le groupe A (Table 6, Article II) alors que 65% des isolats sont dans le groupe B1. Cette divergence demeure sans explication. Le site

urbain 4 est le seul à avoir la plus forte proportion de ses *E. coli* dans le groupe B2, mais cela s'explique par la proportion élevée de pathogènes dans ce site. Comme il a été démontré précédemment, les *E. coli* pathogènes et surtout les ExPEC se retrouvent principalement dans le groupe B2 (Johnson *et al.*, 2002).

Nos résultats démontrent une excellente corrélation avec la littérature. En effet, les EAEC et les EPEC atypiques sont répartis à travers les différents groupes phylogénétiques et les ExPEC sont principalement dans les groupes D et B2 (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Les non-pathogènes sont surtout dans les groupes A et B1, tandis que les pathogènes sont dans les groupes D et B2 majoritairement. Il faut noter qu'un seul isolat de *E. coli* non-pathogène a été retrouvé dans le groupe B2. Les *E. coli* portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens sont répartis également sauf pour le groupe D où un seul *E. coli* portant des gènes de résistance a été retrouvé. Il faut aussi remarquer le pourcentage de 4.2% de porteurs de gènes de résistance qui font partie du groupe phylogénétique B2. Ces *E. coli* sont donc pathogènes et porteurs de gènes de résistance, ce qui laisse planer une certaine inquiétude.

2.6 Expériences à venir

Tel que mentionné précédemment, nous avons trouvé des exceptions à la tendance générale qui associe la présence de gènes de virulence et d'antibiorésistance à la pollution d'origine humaine. Certains sites peu pollués par les humains montrent en effet des pourcentages substantiels de *E. coli* pathogènes et/ou antibiorésistants. Des travaux supplémentaires seront requis pour expliquer ces divergences.

En plus de la présence du gène *tsh* comme indicateur aviaire, il serait intéressant d'évaluer cette puce pour sa capacité à déterminer la provenance de nos isolats de *E. coli* (« BST ou bacterial source tracking »), par exemple en comparant ses résultats à ceux obtenus par des méthodes actuelles de BST comme le ribotypage ou les REP-PCR. Ainsi, nous pourrions mieux connaître l'impact réel des différentes sources de pollution sur la pathogénicité et la présence de gènes de résistance aux agents antimicrobiens. De

plus, les importantes variations géographiques demandent des explorations futures avec plus de points temporels et spatiaux pour les prélèvements.

Notre étude ne comportait pas de zone de culture agricole intensive ou d'élevage de bétail. Or, il serait intéressant de constater l'impact de l'épandage du fumier ou de la présence de bétail sur la pathogénicité de *E. coli*. De même, nous pourrions constater l'effet de l'administration d'antibiotiques aux animaux sur la prévalence de souches porteuses de gènes de résistance.

Des études antérieures ont constaté que les sédiments tenaient lieu de réservoir pour les micro-organismes fécaux comme *E. coli* (Jamieson *et al.*, 2003). La resuspension des bactéries d'origine fécale venant des sédiments peut donc avoir un impact négatif sur la qualité de l'eau (Jamieson *et al.*, 2003). Il pourrait donc être intéressant de faire des prélèvements de *E. coli* dans les sédiments et de les caractériser avec la biopuce pour étudier les différences potentielles dans la pathogénicité et la résistance.

Dans l'avenir, il serait intéressant d'étendre les recherches à des sites québécois comme le fleuve Saint-Laurent ou de tester l'effet des méthodes actuelles de désinfection sur la pathogénicité de *E. coli*. Cela nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes de survie des *E. coli* pathogènes et peut-être d'obtenir un meilleur niveau de désinfection des eaux usées.

De plus, la virulence réelle de ces souches n'ayant pas été testée, il serait possible d'utiliser des modèles animaux pour vérifier la virulence de certaines souches au profil génétique inhabituel. Des études pourraient également inclure la comparaison des souches environnementales à celles qui sont obtenues chez les patients dans les hôpitaux.

Le protocole de mise en culture devra également être modifié pour englober les EHEC qui sont actuellement exclus par les méthodes de culture standard.

Conclusions

L'étude portant sur la pathogénicité et la présence de gènes de résistance aux agents antimicrobiens des *E. coli* prélevés dans le port de Hamilton nous permet tirer les conclusions suivantes :

1. La biopuce d'ADN est un outil moléculaire puissant pour évaluer la plasticité du génome par la surveillance des transferts de gènes de virulence et de gènes de résistances aux agents antimicrobiens;
2. Des proportions relativement élevées de pathogènes et de souches portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens ont été retrouvées, et ces proportions augmentent au printemps;
3. La proportion d'ExPEC dans les eaux de récréation est considérable;
4. La présence de gènes de résistance aux agents antimicrobiens est principalement d'origine humaine;
5. La diversité du génome de *E. coli* ainsi que le transfert d'éléments génétiques mobiles amèneront sûrement à l'émergence de nouveaux pathotypes.

L'étude portant sur les variations géographiques de la pathogénicité et de la présence des gènes de résistance des *E. coli* prélevés dans la région des rivières St-Clair et Détroit nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1. La présence de proportions élevées de *E. coli* pathogènes et/ou portant des gènes de résistance aux agents antimicrobiens est substantiellement liée à la pollution d'origine humaine, bien que l'on trouve également des *E. coli* pathogènes et/ou antibiorésistants dans des sites peu affectés par les humains;
2. La corrélation positive entre la présence de gènes de résistance et l'effluent de la station de traitement des eaux usées peut être une indication sur la nécessité d'améliorer les systèmes de désinfection de l'eau;
3. Une très forte majorité des *E. coli* pathogènes dans l'eau sont des ExPEC et ce, peu importe les sources de pollution;

4. Il y a une importante variation dans la pathogénicité et la présence de gènes de résistance des souches de *E. coli* pour une même région hydrologique.

Les travaux de ce mémoire démontrent donc l'utilité des biopuces d'ADN en microbiologie environnementale.

SECTION IV – Bibliographie

- Abe, C. M., Knutton, S., Pedroso, M. Z., Freymuller, E., and Gomes, T. A.** (2001). An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. *FEMS Microbiology Letters*, **203**(2): 199-205.
- An, Y. J., Kampbell, D. H., and Breidenbach, G. P.** (2002). *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. *Environmental Pollution*, **120**(3): 771-778.
- Anderson, M. A., Stewart, M. H., Yates, M. V., and Gerba, C. P.** (1998). Modeling the impact of body-contact recreation on pathogen concentration in a source drinking water reservoir. *Water Research*, **32**: 3293-3306.
- Angulo, F. J., Tippen, S., Sharp, D. J., Payne, B. J., Collier, C., Hill, J. E., Barrett, T. J., Clark, R. M., Geldreich, E. E., Donnell, H. D., Jr., and Swerdlow, D. L.** (1997). A community waterborne outbreak of salmonellosis and the effectiveness of a boil water order. *American Journal of Public Health*, **87**(4): 580-584.
- Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M. R.** (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, **29**(7): 1303-1310.
- Agence de Santé Publique du Canada** (2004). Relevé des maladies transmissibles au Canada. Vol. 30-15. <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol30/rm3015fa.html>.
- Barbe, D. E., and Francis, J. C.** (1995). An analysis of seasonal fecal coliform levels in the Tchefuncte River. *Water Research Bulletin*, **31**: 141-146.
- Bennett, J. V., Homberg, S. D., and Rogers, M. F.** (1987). Infectious and parasitic diseases. *American Journal Preventive Medicine*, **3**: 102-114.
- Bettelheim, K. A.** (1986). Commemoration of the publication 100 years ago of the papers by Dr. Th. Escherich in which are described for the first time the organisms that bear his name. *Zentralbl für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene (Series A)*, **261**: 255-265.

- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**(5331): 1453-1474.
- Bonacorsi, S. P., Clermont, O., Tinsley, C., Le Gall, I., Beaudoin, J. C., Elion, J., Nassif, X., and Bingen, E. (2000). Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infection and Immunity*, **68**(4): 2096-2101.
- Bruant, G., Maynard, C., Bekal, S., Gaucher, I., Masson, L., Brousseau, R., and Harel, J. (2006). Development and validation of an oligonucleotide microarray for the detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(5): 3780-3784.
- Buckley, R., Clough, E., Warnken, W., and Wild, C. (1998). Coliform bacteria in streambed sediments in a subtropical rainforest conservation reserve. *Water Research*, **32**(6): 1852-1856.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (1996). *Shigella sonnei* outbreak associated with contaminated drinking water – Island Park, Idaho. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **45**: 229-231.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (1999). Outbreak of *E. coli* O157:H7 and *Campylobacter* – New York. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **48**: 803-804.
- Chalmers, R. M., Aird, H., and Bolton, F. J. (2000). Waterborne *Escherichia coli* O157. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 124S-132S.
- Chauret, C., Springthorpe, S., and Sattar, S. (1999). Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Canadian Journal of Microbiology*, **45**: 257-262.
- Chern, E. C., Tsai, Y. L., and Olson, B. H. (2004). Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(1): 356-362.

- Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K., and Levy, D. D.** (2001). Microarray analysis of microbial virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(7): 3258-3263.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E.** (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(10): 4555-4558.
- Crabill, C., Donald, R., Snelling, J., Foust, R., and Southam, G.** (1999). The impact of sediment fecal coliform reservoirs on seasonal water quality in Oak Creek, Arizona. *Water Research*, **33**(9): 2163-2171.
- Craun, G. F., and Calderon, R. I.** (2003). "Waterborne outbreaks in the United States, 1971-2000. *Drinking Water Regulation and Health*." John Wiley & Sons, New York, NY.
- de Louvois, J.** (1994). Acute bacterial meningitis in the newborn. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **34 Suppl A**: 61-73.
- Donnenberg, M. S.** (2002). *Escherichia coli Virulence Mechanisms of a versatile pathogen*. Elsevier Science (USA).
- Doyle, M. P., and Schoeni, J. L.** (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, **48**(4): 855-856.
- Environnement Canada** (2005). St. Lawrence Centre. http://www.qc.ec.gc.ca/csl/inf/inf023_e.html.
- Edge, T. A., and Hill, S.** (2005). Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, **51**(6): 501-505.
- Emde, R. N.** (1995). Diagnosis, assessment, and individual complexity. *Archives of General Psychiatry*, **52**(8): 637-638; discussion 654-656.
- Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguenec, C., and Denamur, E.** (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, **21**(6): 1085-1094.

- Fogarty, L. R., Haack, S. K., Wolcott, M. J., and Whitman, R. L.** (2003). Abundance and characteristics of the recreational water quality indicator bacteria *Escherichia coli* and enterococci in gull feces. *Journal of Applied Microbiology*, **94**: 865-878.
- Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., Gillespie, B., and Sobel, J. D.** (2000). Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Annals of Epidemiology*, **10**(8): 509-515.
- Galane, P. M., and Le Roux, M.** (2001). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* isolated from young South African children with diarrhoeal diseases. *Journal of Health, Population and Nutrition*, **19**(1): 31-38.
- Gardner, T. B., and Hill, D. R.** (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**(1): 114-128.
- Goss, M. J., Rollins, K. S., McEwzn, K., Shaw, J. R., and Lammer-Helps, H.** (2001). The management of manure in Ontario with respect to water quality. *Commissioned report to the Walkerton Inquiry*. University of Guelph.
- Gyles, C. L.** (1994). "Escherichia coli in domestic animals and humans." CAB International.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., and Goebel, W.** (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microbial Pathogenesis*, **8**(3): 213-225.
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T. A., Bekal, S., Fairbrother, J. M., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., and Brousseau, R.** (2006). A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* from Great Lakes recreational waters. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(6): 4200-4206.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C. G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., and Shinagawa, H.** (2001). Complete

genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Research*, **8**(1): 11-22.

- Heitman, T. L., Frederick, L. M., Viste, J. R., Guselle, N. J., Morgan, U. M., Thompson, R. C., and Olson, M. E.** (2002). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**(6): 530-541.
- Jamieson, R. C., Gordon, R. J., Tatttrie, S. C., and Stratton, G. W.** (2003). Sources and persistence of fecal coliform bacteria in a rural watershed. *Water Quality Research Journal of Canada*, **38**(1): 33-47.
- Janda, J., and Abbott, S. L.** (1998). "*The Enterobacteria*." Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
- Johnson, J. R.** (2003). Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, **17**(2): 261-278, viii.
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., O'Bryan, T. T., and Maslow, J. N.** (2002). Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *The Journal of Infectious Diseases*, **185**(10): 1439-1447.
- Johnson, J. R., and Russo, T. A.** (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **139**(3): 155-162.
- Johnson, J. R., Stell, A. L., Delavari, P., Murray, A. C., Kuskowski, M., and Gaastra, W.** (2001). Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. *The Journal of Infectious Diseases*, **183**(6): 897-906.
- Kasper, C. W., and Burgess, J. L.** (1990). Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Canadian Journal of Microbiology*, **36**: 891-894.
- Keene, W. E., McAnulty, J. M., Hoesly, F. C., Williams, L. P., Jr., Hedberg, K., Oxman, G. L., Barrett, T. J., Pfaller, M. A., and Fleming, D. W.** (1994). A

swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *The New England Journal of Medicine*, **331**(9): 579-584.

- Knutton, S., Shaw, R., Phillips, A. D., Smith, H. R., Willshaw, G. A., Watson, P., and Price, E.** (2001). Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **33**(1): 32-40.
- Knutton, S., Shaw, R. K., Bhan, M. K., Smith, H. R., McConnell, M. M., Cheasty, T., Williams, P. H., and Baldwin, T. J.** (1992). Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. *Infection and Immunity*, **60**(5): 2083-2091.
- Korczak, B., Frey, J., Schrenzel, J., Pluschke, G., Pfister, R., Ehricht, R., and Kuhnert, P.** (2005). Use of diagnostic microarrays for determination of virulence gene patterns of *Escherichia coli* K1, a major cause of neonatal meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**(3): 1024-1031.
- Lauber, C. L., Glatzer, L., and Sinsabaugh, R. L.** (2003). Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in recreational waters. *Journal of Great Lakes Research*, **29**(2): 301-306.
- LCDC Canada (Laboratory Centre for Disease Control).** (1998). Santé Canada. Material safety data sheets. <http://www.hc-gc.ca/hpb/lcdc/biosafety/msds>.
- Lemarchand, K., Masson, L., and Brousseau, R.** (2004). Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. *Critical Reviews in Microbiology*, **30**(3): 145-172.
- Levine, M. M., and Edelman, R.** (1984). Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiologic Reviews*, **6**: 31-51.
- Mackenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., and Davis, J. P.** (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, **331**: 161-167.

- Martins, M. T., Rivera, I. G., Clark, D. L., and Olson, B. H.** (1992). Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal *o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside-4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide media. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(9): 3095-3100.
- Maynard, C., Fairbrother, J. M., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., Lariviere, S., and Harel, J.** (2003). Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, **47**(10): 3214-3221.
- McKeon, D. M., Calabrese, J. P., and Bissonnette, G. K.** (1995). Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural ground water supplies. *Water Research*, **29**: 1902-1908.
- McMath, S. M., and Holt, D. M.** (2000). The fate of *Escherichia coli* through water treatment and in distribution. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, **29**: 117S-123S.
- Ministère de l'Environnement de l'Ontario.** (2004). <http://www.ene.gov.on.ca/cons/3670f.htm>.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., and Hacker, J.** (2004). Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *Journal of bacteriology*, **186**(10): 3086-3096.
- Mokady, D., Gophna, U., and Ron, E. Z.** (2005). Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *International Journal of Medical Microbiology*, **295**(6-7): 455-462.
- Muhldorfer, I., Blum, G., Donohue-Rolfe, A., Heier, H., Olschlager, T., Tschape, H., Wallner, U., and Hacker, J.** (1996). Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from environmental water habitats and from stool samples of healthy volunteers. *Research in Microbiology*, **147**(8): 625-635.
- Muhldorfer, I., and Hacker, J.** (1994). Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis*, **16**(3): 171-181.

- Mulamattathil, S. G., Esterhuysen, H. A., and Pretorius, P. J.** (2000). Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in a virtually closed water reticulation system. *Journal of Applied Microbiology*, **88**(6): 930-937.
- Nataro, J. P., and Kaper, J. B.** (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, **11**(1): 142-201.
- Ng, L., Khakhria, R., Woodward, D., and Johnson, W.** (1997). National laboratory surveillance of enteric pathogens. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, **8**: 133-136.
- NWRI (National Water Research Institute).** (2005).
- O'Connor, D. R.** (2002). "Report of the Walkerton Inquiry – Part 2. A Strategy for safe drinking water." Queen's Printer for Ontario.
- O'Connor, K. M.** (2003). "Remedial action plan for Hamilton Harbour: stage 2 update 2002." Canada Centre for Inland Waters, Burlington, ON.
- Obi, C. L., Green, E., Bessong, P. O., Villiers, B., Hoosen, A. A., Igumbor, E. O., and Potgieter, N.** (2004). Gene encoding virulence markers among *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic stool samples and river sources in rural Venda communities of South Africa. *Water SA*, **30**(1): 37-42.
- Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., and Hacker, J.** (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **19**: 517-521.
- Olsen, S. J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., McKee, G., Fox, K., Bibb, W., and Mead, P.** (2002). A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerging Infectious Diseases*, **8**(4): 370-375.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé)** (2004). Water Sanitation and Health. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/burden/en/.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé)** (2005). Relevé épidémiologique hebdomadaire # 31. **80**: 261-268. <http://www.who.int/wer>.

- ONU (Organisation des Nations Unies) (1997). *Comprehensive assessment of the freshwater resources of the world: Report of the secretary-general*. Commissions on sustainable development, Fifth session, 7-25.
- Paciorek, J. (2002). Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, **51**(7): 548-556.
- Payment, P., Plante, R., and Cejka, P. (2001). Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater treatment facility. *Canadian Journal of Microbiology*, **47**: 188-193.
- Perna, N. T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamouisis, K. D., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A., and Blattner, F. R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, **409**(6819): 529-533.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., and Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, **67**(2): 546-553.
- Poy, C. (2003). L'eau, voie royale pour les genes résistants. *Planètebleue.info*.
- Pulg, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., and Girones, R. (1994). Detection of adenovirus and enterovirus in polluted waters by nested PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2963-2970.
- Raghubeer, E. V., and Matches, J. R. (1990). Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**(4): 803-805.
- Rice, E. W., Clark, R. M., and Johnson, C. H. (1999). Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Emerging Infectious Diseases*, **5**(3): 461-463.

- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., and Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine*, **308**(12): 681-685.
- Robins-Browne, R. M., Bordun, A. M., Tauschek, M., Bennett-Wood, V. R., Russell, J., Oppedisano, F., Lister, N. A., Bettelheim, K. A., Fairley, C. K., Sinclair, M. I., and Hellard, M. E. (2004). *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, **10**(10): 1797-1805.
- Rose, J. B. (1997). "New risks identified for viral and protozoan waterborne disease." Proceedings of the 1996 OCED biotechnology for water use and conservation: The Mexico 96 workshop, Mexico.
- Russo, T. A., and Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, **181**(5): 1753-1754.
- Russo, T. A., and Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, **5**(5): 449-456.
- Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y., and Miller, R. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage and surface water. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(3): 1394-1404.
- Santé Canada. (2005). <http://www.hc-sc.gc.ca/>.
- Schaefer, F. W. (1999). "Waterborne pathogens, Manual of water supply practices". AWWA Manual M48. First edition. Denver, CO.
- SCRCA (St. Clair Region Conservation Authority). (2004). Lake St. Clair: A canadian perspective. <http://www.scrca.on.ca/>
- Sobsey, M. D., Perdue, R., Overton, M., and Fisher, J. (2003). Factors influencing faecal contamination in coastal marinas. *Water Science Technology*, **47**: 199-204.

- Swenson, D. L., Bukanov, N. O., Berg, D. E., and Welch, R. A. (1996). Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infection and Immunity*, **64**(9): 3736-3743.
- Swerdlow, D. L., Woodruff, B. A., Brady, R. C., Griffin, P. M., Tippen, S., Donnell, H. D., Jr., Geldreich, E., Payne, B. J., Meyer, A., Jr. and Wells, J. G. (1992). A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of Internal Medicine*, **117**(10): 812-819.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., and Schleifer, K. H. (2000). Microbiological safety of drinking water. *Annual Reviews in Microbiology*, **54**: 81-127.
- Thompson, J. S., Hodge, D. S., and Borczyk, A. A. (1990). Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**(10): 2165-2168.
- Tibbetts, J. (2005). Combined sewer systems: Down, dirty and out of date. *Environmental Health Perspectives*, **113**: A464-A467.
- Trabulsi, L. R., Keller, R., and Tardelli Gomes, T. A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, **8**(5): 508-513.
- USEPA (2006). The Great Lakes: An Environmental Atlas and Resource Book. <http://www.epa.gov/glnpo/atlas/>.
- Ville de Hamilton. (2003). Travaux publics sur les eaux usées. [http://www.myhamilton.ca/myhamilton/CityandGovernment/CityDepartments/PublicWorks/Water/CombinedSewerOverflow\(CSO\).htm](http://www.myhamilton.ca/myhamilton/CityandGovernment/CityDepartments/PublicWorks/Water/CombinedSewerOverflow(CSO).htm).
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Sonnenberg, M. S., and Blattner, F. R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(26): 17020-17024.
- Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, **279**(5353): 996-997.